



Instituto Politécnico Nacional

Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología

TÍTULO DE LA TESINA:

**Actividad anti-proliferativa en células HeLa, de
extractos de los hongos *Fusarium sp*,
Graphostroma sp,**

***Hypoxylon falciforme* y *Biscognauxia mediterranea*
aislados de *Taxus globosa***

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO FARMACÉUTICO

PRESENTA:

Daniela Itzel Pacheco Cerón

**ASESOR EXTERNO: Dr. Luis Bernardo Flores Cotera
ASESOR INTERNO: I.BT Verónica Chávez Infante**

México, D.F. Noviembre de 2013

México D. F. a 24 de septiembre del 2013.
Of. No. PTIII-Farmacéutica-002/2013B
PACHECO CERÓN DANIELA ITZEL
ALUMNA DEL PROYECTO TERMINAL III
DEL OCTAVO NIVEL DE LA CARRERA DE
INGENIERÍA FARMACÉUTICA

Presente

Comunico a Usted que, como resultado de la evaluación por parte de la Academia de Opción Curricular, con fecha 24 de septiembre del 2013, ha quedado registrada su actividad a realizar en el Proyecto Terminal en la modalidad "PROYECTO DE INVESTIGACIÓN" en el "Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN" desarrollando el trabajo titulado "Actividad anti-proliferativa en células HeLa, de extractos de los hongos *Fusarium sp*, *Graphostroma sp*, *Hypoxylon falciforme* y *Biscognauxia mediterránea* aislados de *Taxus globosa*.", bajo la dirección externa del Dr. Luis Bernardo Flores Cotera e interna del IBT. Verónica Chávez Infante.

De cumplir con las condiciones que abajo se indican, acreditará la Opción Curricular de Titulación. Así mismo, me permito recordarle que dicha actividad deberá concluir en el octavo nivel con la entrega del informe técnico final, de conformidad con los lineamientos que para tal fin ha establecido la academia mencionada.

CONDICIONES

1. Permanecer en la misma modalidad en el Proyecto Terminal I, II y III
2. Obtener una calificación igual o superior a 8.0 en Proyecto Terminal I, Proyecto terminal II y en Proyecto Terminal III
3. Cumplir con el 90% de asistencia a las actividades asignadas y en la asignatura
4. Cumplir con los demás requisitos que se fijan en el programa de estudios de la asignatura

Sin otro particular por el momento, le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Vo Bo

DRA. MARIA GUADALUPE RAMIREZ SOTELO
PROFESOR DE LA ASIGNATURA PROYECTO
TERMINAL III.

M. EN C. GUADALUPE ORDORICA MORALES
JEFA DE LA CARRERA DE INGENIERÍA
FARMACÉUTICA

ccp Expediente de Proyecto Terminal
Archivo

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Mario de los Reyes Pacheco Vera y Patricia Cerón Arroyo...

Por su apoyo incondicional, sus enseñanzas de vida y por brindarme las herramientas necesarias para concluir mi carrera con éxito.

A mi hermana Karla A. Pacheco Cerón...

Por siempre creer en mí, estar cuando la necesito y no permitir que el miedo me detenga.

A mis amigos Daniel Martínez Zamarrón, Marielle L. Godínez Ramos, Lorena I. Medina Aymerich y Oscar Gerardo Nieto...

Por estar presentes durante toda la carrera brindándome su amistad, apoyo y sabiduría.

La investigación desarrollada en el presente trabajo fue realizada en el Departamento de Biotecnología y Bioingeniería (Laboratorio de Metabolismo Secundario de Microorganismos) del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional unidad Zacatenco, contando con la asesoría del Dr. Luis Bernardo Flores Cotera y en colaboración con la Dra. Zoila R. Flores Bustamante. Para su desarrollo, el proyecto contó con el apoyo del Fondo Mixto CONACYT-Gobierno del Estado de Hidalgo, proyecto clave: 49004 y Fondo Conacyt-SEMARNAT proyecto 2004-01-368 Básica.

ÍNDICE GENERAL

1. Introducción.....	8-13
1.1 Cáncer.....	8
1.2 Apoptosis.....	8-9
1.3 Tratamiento.....	9-10
1.4 <i>Taxus globosa</i>	11
1.5 Hongos endófitos.....	11-12
1.6 Ensayo de MTT.....	12-13
2. Justificación.....	13
3. Hipótesis.....	13
4. Objetivos.....	13-14
4.1 Objetivo general.....	13
4.2 Objetivos específicos.....	14
5. Material y métodos.....	14-20
5.1 Hongos.....	14
5.2 Métodos.....	14-20
6. Resultados.....	20-43
6.1 Morfología macroscópica.....	20-21
6.2 Análisis de la actividad antiproliferativa en células HeLa, de los extractos de los cultivos de los hongos <i>Biscognauxia mediterranea</i> , <i>Hypoxylon falciforme</i> , <i>Graphostroma sp</i> y <i>Fusarium sp</i>	21-34
6.2.1 <i>Biscognauxia mediterranea</i>	22-24
6.2.2 <i>Hypoxylon falciforme</i>	24-27
6.2.3 <i>Graphostroma sp</i>	28-30
6.2.4 <i>Fusarium sp</i>	30-33
6.3 Cultivo masivo.....	35
6.4 Cromatografía.....	35-36
6.5 Análisis de la actividad antiproliferativa en células HeLa de las fracciones del extracto del cultivo masivo del hongo <i>Graphostroma sp</i>	36-43
6.5.1 Fracción 1.....	37-38
6.5.2 Fracción 2.....	38-39
6.5.3 Fracción 3.....	39-40
6.5.4 Fracción 4.....	40-41
6.5.5 Fracción 5.....	41-42
6.5.6 Fracción 6.....	42-43
6.5.7 Fracción 7.....	43
7. Conclusiones.....	44
8. Bibliografía.....	44-45
9. Anexo A.....	46-47
10. Anexo B.....	48
11. Anexo C.....	49

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1. Compuestos bioactivos producidos por hongos	11
Tabla 2. Compuestos bioactivos aislados a partir de cultivos de hongos del género <i>Hypoxylon</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Biscognauxia</i> y <i>Graphostroma</i>	12
Tabla 3. Composición del medio Czapek-Dox Broth.....	17
Tabla 4. Análisis de antiproliferación de los extractos de <i>Biscognauxia mediterranea</i> en el intervalo de concentraciones de 0.5 % v/v hasta 0.7 % v/v	22
Tabla 5. Análisis de antiproliferación del extracto de <i>Biscognauxia mediterranea</i> , primera réplica, en el intervalo de concentraciones de 0.3 % v/v hasta 1.2 % v/v	23
Tabla 6. Análisis de antiproliferación del extracto de <i>Biscognauxia mediterranea</i> , segunda réplica, en el intervalo de concentraciones de 0.3 % v/v hasta 1.2 % v/v	23
Tabla 7. Análisis de antiproliferación de los extractos de <i>Hypoxylon falciforme</i> en el intervalo de concentraciones de 0.3 % v/v hasta 0.6 % v/v.....	24
Tabla 8. Análisis de antiproliferación del extracto de <i>Hypoxylon falciforme</i> , réplica 1, en el intervalo de concentraciones de 0.3 % v/v hasta 0.8 % v/v.....	25
Tabla 9. Análisis de antiproliferación del extracto de <i>Hypoxylon falciforme</i> , réplica 2, en el intervalo de concentraciones de 0.3 % v/v hasta 2.4 % v/v.....	26
Tabla 10. Análisis de antiproliferación del extracto de <i>Hypoxylon falciforme</i> en el intervalo de concentraciones de 0.3 % v/v hasta 2 % v/v	27
Tabla 11. Análisis de antiproliferación de los extractos de <i>Graphostroma sp</i> en el intervalo de concentraciones de 0.1 % v/v hasta 0.3 % v/v de ambas réplicas	28
Tabla 12 Análisis de antiproliferación del extracto de <i>Graphostroma sp</i> , réplica 1, en el intervalo de concentraciones de 0.1 % v/v hasta 0.45 % v/v	29
Tabla 13. Análisis de antiproliferación del extracto de <i>Graphostroma sp</i> , réplica 2, en el intervalo de concentraciones de 0.1 % v/v hasta 0.45 % v/v	29
Tabla 14. Análisis de antiproliferación de los extractos de <i>Fusarium sp</i> en el intervalo de concentraciones de 0.003 % v/v hasta 0.3 % v/v.....	30
Tabla 15. Análisis de antiproliferación de los extractos de <i>Fusarium sp</i> en el intervalo de concentraciones de 0.00003 % v/v hasta 0.0003 % v/v	31
Tabla 16. Análisis de antiproliferación del extracto de <i>Fusarium sp</i> , réplica 2, en el intervalo de concentraciones de 0.000024 % v/v hasta 0.0002 % v/v	32
Tabla 17. Análisis de antiproliferación del extracto de <i>Fusarium sp</i> , réplica 1, en el intervalo de	

concentraciones de 0.000024 % v/v hasta 0.0002 % v/v	33
Tabla 18. Comparación de la IC ₅₀ calculados y reportados anteriormente de las cepas SG 01, SG 22, HA 40 y TA 76.....	34
Tabla 19. Condiciones de los diferentes cultivos y la mas final obtenida de cada cultivo.....	35
Tabla 20. Masa de las fracciones obtenidas de la CC ...	36
Tabla 21. Cálculo aproximado de la IC50 de cada cultivo en base a la primera extracción realizada.....	37
Tabla 22. Análisis de antiproliferación de la primera fracción obtenida en la CC.....	37
Tabla 23. Análisis de antiproliferación de la segunda fracción obtenida en la CC.....	38
Tabla 24. Análisis de antiproliferación de la tercera fracción obtenida en la CC.....	39
<i>Tabla 25. Análisis de antiproliferación de la cuarta fracción obtenida en la CC.....</i>	40
Tabla 26. Análisis de antiproliferación de la quinta fracción obtenida en la CC.....	41
Tabla 27. Análisis de antiproliferación de la sexta fracción obtenida en la CC.....	42
Tabla 28. Análisis de antiproliferación de la séptima fracción obtenida en la CC.....	43

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Cultivo de <i>Biscognauxia mediterranea</i>	20
Figura 2. Cultivo de <i>Hypoxilon falciforme</i>	21
Figura 3. Cultivo de <i>Graphostroma sp.</i>	21
Figura 4. Cultivo de <i>Fusarium sp.</i>	21
Figura 5. Gráfica de % de supervivencia de células HeLa vs concentración de los extractos de <i>Biscognauxia mediterranea</i>	22
Figura 6. Gráfica de % de supervivencia de células HeLa vs concentración de los extractos de <i>Biscognauxia mediterranea</i> , réplica 1 y 2.....	24
Figura 7. Gráfica de % de supervivencia de células HeLa vs concentración de los extractos de <i>Hypoxilon falciforme</i> , réplica 1 y 2.....	25
Figura 8. Gráfica de % de supervivencia vs concentración del extracto de <i>Hypoxilon falciforme</i> , réplica 1 y 2, segundo Análisis de antiproliferación.....	26
Figura 9. Gráfica de % de supervivencia vs concentración del extracto de <i>Hypoxilon falciforme</i> , réplica 1, 3° Análisis de antiproliferación.....	27
Figura 10. Gráfica de % de supervivencia vs concentración de los extractos de <i>Graphostroma</i> <i>sp.</i> , réplica 1 y 2.....	28
Figura 11. Gráfica de % de supervivencia vs concentración de los extractos de <i>Graphostroma</i> <i>sp.</i> , réplica 1 y 2, segundo análisis de antiproliferación.....	29
Figura 12. Gráfica de % de supervivencia vs concentración de los extractos de <i>Fusarium sp.</i> , réplica 1 y 2.....	31
Figura 13. Gráfica de % de supervivencia vs concentración de los extractos de <i>Fusarium sp.</i> , réplica 1 y 2, segundo análisis de antiproliferación...	32
Figura 14. Gráfica de % de supervivencia vs concentración de los extractos de <i>Fusarium sp.</i> , réplica 1 y 2, tercer análisis.....	33
Figura 15. Gráfica de % de supervivencia vs concentración de la fracción 1.....	38
Figura 16. Gráfica de % de supervivencia vs concentración de la fracción 2.....	39
Figura 17. Gráfica de % de supervivencia vs concentración de la fracción 3.....	40
Figura 18. Gráfica de % de supervivencia vs concentración de la fracción 4.....	41
Figura 19. Gráfica de % de supervivencia vs concentración de la fracción 5.....	42
Figura 20. Gráfica de % de supervivencia vs concentración de la fracción 6.....	43
21. Gráfica de % de supervivencia vs concentración de la fracción 7.....	43

ABREVIATURAS

PDA: Agar papa dextrosa

μ L: microlitros

mL: mililitros

DMEM: medio Eagle Modificado de Dulbecco

DMSO: di-metil-sulfóxido

MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

SFB: suero fetal bovino

μ m: micrómetros

CCF: cromatografía en capa fina

CC: cromatografía en columna

cm: centímetros

IC₅₀: Concentración de inhibición de crecimiento del 50% de células

% v/v: Porcentaje volumen a volumen

% w/v: Porcentaje peso a volumen

AIE: Antiinflamatorio esteroideo

SAR: relación estructura actividad

g: gramos

I. INTRODUCCIÓN

CANCER

Se le conoce como cáncer a un grupo de más de 100 enfermedades, por lo que existen diferentes tipos de cáncer. Todo cáncer empieza por un crecimiento anormal y descontrolado de células. Si no se trata apropiadamente puede provocar casos severos de enfermedad y/o la muerte ⁽²⁾.

El cáncer ha sido clasificado como una enfermedad crónico-degenerativa, que presenta una evolución prolongada y progresiva si no sufre interferencia en alguna de sus fases, así como también un proceso común a un grupo heterogéneo de enfermedades que difieren en etiología, frecuencia y manifestaciones clínicas ⁽¹⁾.

Las células se vuelven cancerígenas debido a un daño en el ADN. Una célula normal puede reparar el daño en el ADN o morir pero una cancerígena no es capaz de reparar el daño y no morirá, por el contrario, seguirá dividiéndose aunque esas células no sean requeridas y las nuevas células tendrán el mismo daño en el ADN al igual que la célula inicial.

La mayoría de los daños en el ADN que derivan en un cáncer son provocados por errores durante la división celular o por un factor en el ambiente (agentes químicos, físicos y biológicos), aunque también puede ser hereditario ⁽²⁾.

Una de las principales características de las células cancerígenas es su habilidad para reproducirse rápidamente, lo que provoca la acumulación de células cancerosas conocidas como tumor, las células cancerosas con frecuencia se trasladan a otras partes del organismo donde empiezan a crecer y formar nuevos tumores que reemplazan al tejido normal, lo que se conoce como metástasis ⁽³⁾.

Los distintos tipos de cáncer están agrupados en las siguientes categorías principales ⁽⁴⁾:

- Carcinoma: cáncer que empieza en la piel o en tejidos que revisten o cubren los órganos internos.
- Sarcoma: cáncer que empieza en hueso, en cartílago, tejido graso, músculo, vasos sanguíneos u otro tejido conjuntivo o de soporte.
- Leucemia: cáncer que empieza en el tejido en el que se forma la sangre, como la médula ósea, y causa que se produzcan grandes cantidades de células sanguíneas anormales y que entren en la sangre.
- Linfoma y mieloma: cáncer que empieza en las células del sistema inmunitario.

Cáncer del sistema nervioso central: cáncer que empieza en los tejidos del cerebro y de la médula espinal ⁽³⁾.

APOPTOSIS

Apoptosis, o muerte celular programada, es un mecanismo que permite a organismos multicelulares regular, durante su desarrollo, el número de células en tejidos y para eliminar células innecesarias o células viejas. La bioquímica de la apoptosis ha sido bien estudiada en

los últimos años por lo que hoy en día se conocen los mecanismos. El camino de la apoptosis envuelve una serie de reguladores, positivos y negativos, de proteasas (caspasas) ⁽⁵⁾.

La apoptosis tiene un papel importante en la homeostasis del organismo, que regula el equilibrio entre las células que se replican y las que mueren. Existen 2 vías de señalización que inducen la apoptosis ⁽⁷⁾:

- Vía intrínseca.

Se da por el estrés oxidativo, que daña las mitocondrias de las células. En esta vía se da la liberación del citocromo C para formar apoptosomas, conformados de citocromo C, Apaf-1 y procaspasa-9, que son capaces de hidrolizar la procaspasa-3 a caspasa-3 para que se dé la cascada de caspasas que se encargan de ejecutar la apoptosis.

- Vía extrínseca.

Es mediada por los receptores de muerte TNFR-1 y Fas L que son los encargados de las señalizaciones intracelulares que desencadenan la cascada de las caspasas.

TRATAMIENTO

A continuación se describen los tratamientos existentes contra el cáncer, el tratamiento depende del tipo de cáncer, la etapa en que se encuentra el cáncer, edad, entre otros factores ⁽²⁾.

- Cirugía

Puede ser utilizada como diagnóstico, tratamiento o incluso como método preventivo. Es el método que ofrece mayor probabilidad de cura, especialmente en los casos donde no ha habido metástasis.

- Quimioterapia

Se refiere al uso de fármacos potentes para el tratamiento del cáncer, los fármacos que se administran dependen del tipo de cáncer y del objetivo de la quimioterapia, los objetivos que puede tener son: evitar metástasis, disminuir el crecimiento de las células, matar células cancerígenas que han hecho metástasis, aliviar dolores provocados por el cáncer y para curar el cáncer.

La desventaja radica en que no solo mata a las células cancerígenas, sino que también daña a las células normales.

- Radioterapia

Es uno de los tratamientos más comunes, la radiación es utilizada para matar las células cancerígenas. Un equipo especial manda altas dosis de radiación hacia las células cancerígenas o el tumor. La radiación también daña a las células normales en la periferia del tumor.

- Terapia dirigida

Es un nuevo tratamiento que utiliza fármacos u otras sustancias que identifican de manera más precisa a las células cancerígenas, los fármacos pueden tener diferentes efectos como: inductores de apoptosis, inhibidores de enzimas, inhibidores de angiogénesis, entre otros.

- Inmunoterapia

Es un tratamiento que utiliza el sistema inmunológico propio para ayudar a destruir las células cancerígenas.

- Trasplante de células madre

El trasplante de células madre se realiza a la par de la quimioterapia y/o la radioterapia, debido a que estos tratamientos destruyen células cancerígenas como normales (entre ellas las células madre de medula ósea), el trasplante se hace justo después de la quimioterapia o radioterapia para reemplazar aquellas que fueron destruidas. El trasplante se realiza como una transfusión sanguínea. Generalmente el trasplante se hace de células madre de medula ósea o cordón umbilical.

- Tratamientos específicamente dirigidos contra el cáncer.

Hasta finales de los años noventa, la mayoría de los medicamentos utilizados en el tratamiento del cáncer funcionaban matando células cancerosas, desafortunadamente los agentes usados en las quimioterapias también causaban la muerte de algunas células normales produciendo serios efectos secundarios. Por tanto en la actualidad se están generando medicamentos más efectivos contra células cancerosas y menos agresivos con células normales⁽⁴⁾. Entre los cuales se encuentran:

- Medicamentos que inducen apoptosis.

Durante mucho tiempo la actividad citotóxica de los medicamentos citoterapéuticos se atribuyeron a su capacidad de inducir la muerte genotóxica, no obstante, se han acumulado evidencias que indican que éstos agentes ejercen sus efectos citotóxicos induciendo apoptosis en células del tumor, los cuales actúan sobre los receptores de muerte TNFR-1 y Fas L. Algunas de las drogas que inducen apoptosis en células cancerosas son el etopósido, camptotecina, tenipósido, vincristina, cisplatino, ciclofosfamida, y doxorubicina.

- Inhibidores de señales de crecimiento.

Los factores de crecimiento informan a las células cuando crecer y dividirse, por tanto inhibiendo los factores de crecimiento (PDGF, FGF, IGF-1, IGF-2, entre otros) es posible evitar la proliferación de las células cancerosas⁽⁴⁾. Algunos ejemplos de estas sustancias son el trastuzumab, gefitinib, imatinib, cetuximab y el paclitaxel (Taxol®)⁽⁶⁾.

Dentro de los medicamentos que inducen inhiben el crecimiento el Taxol® es aislado de la corteza de un árbol (*Taxus globosa*), existen varios estudios de la ruta biosintética y nuevas fuentes de obtención del Taxol®.

Taxus globosa

Taxus globosa es una gimnosperma endémica de México cuyas propiedades anticancerígenas han sido estudiadas principalmente por la producción del paclitaxel, sin embargo, debido al crecimiento lento del *Taxus globosa*, las bajas concentraciones en que produce paclitaxel (se necesitan 10,000 kg de corteza del *T. globosa* para producir un kilogramo de paclitaxel⁽¹⁰⁾) y que se encuentra bajo “protección especial” por la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-ECOL-2001) la tendencia es buscar nuevas sustancias anticancerígenas en organismos unicelulares y pluricelulares asociados al *T. globosa*.

HONGOS ENDÓFITOS

El termino endófito fue propuesto por De Bary en 1866 para referirse a los microorganismos que viven en el tejido de una planta, pero fueron Bacon y White los que proporcionaron una definición bien aceptada, definiendo endófitos como “microbios que colonizan tejidos internos vivos de una planta sin causar ningún efecto negativo inmediato” ⁽¹¹⁾

Los endófitos de plantas raramente causan problemas, coexisten con sus hospederos bajo la mayoría de las circunstancias, pueden producir metabolitos secundarios que los habilitan para sobrevivir en el espacio intersticial de la planta. La literatura indica que el 51% de las sustancias bioactivas aisladas de hongos endófitos eran desconocidas, desde el descubrimiento del paclitaxel se han aislado de endófitos aproximadamente 100 compuestos con actividad anticancerígena.

Tabla 1. Compuestos bioactivos producidos por hongos

<i>Hongo</i>	<i>Compuesto</i>	<i>Actividad</i>
<i>Claviceps purpurea</i>	Ergotamina	Anti-migrañas
<i>Rhizopus nigricans</i>	Cortisona	Corticosteroide, Inmunosupresor
	Prednisolona	AIE
<i>Penicillium notatum</i>	Penicilina	Antibiótico
<i>Cephalosporium acremonium</i>	Cefalosporinas	Antibiótico
<i>P. patulum</i>	Griseofulvina	Antimicótico
<i>Tolypocladium inflatum</i>	Ciclosporina	Inmunosupresor
<i>Aspergillus terreus</i>	Lovastatina	Inhibidores de la síntesis de colesterol

La cepa de *Fusarium sp* ha sido estudiada en búsqueda de sustancias bioactivas, sin embargo, de las otras cepas no existen reportes. La tabla 2 muestra hongos del mismo género que los utilizados en el trabajo que reportan algún efecto terapéutico.

Tabla 2. Compuestos bioactivos aislados a partir de cultivos de hongos del género *Hypoxylon*, *Fusarium*, *Biscognauxia* y *Graphostroma*.

Hongo	Compuesto	Actividad	Estudios
<i>Hypoxylon truncatum</i>	Hypoxylonoles ⁽¹³⁾	Anti-proliferación	HUVECs HUAVECs
<i>Hypoxylon fragiforme</i>	Hypoxyxylerona ⁽¹⁴⁾	Anti-tumoral	In vitro
<i>Fusarium sp.</i>	Fumitremorgin C ⁽¹⁶⁾	Agente quimiosensibilizador	Células MCF-7 transfectadas
<i>Fusarium oxysporum</i>	Beauvericina ⁽¹⁵⁾	Anti-tumoral	Estudios en líneas celulares (U-937, BC-1)
	Fusarielina ⁽¹⁷⁾	Anti-proliferación	HUVECs Células HL-60
	Vincristina ⁽¹⁵⁾	Anti-cancerígeno	Uso terapéutico
	Bikaverina ⁽¹⁵⁾	Anti-tumoral, antibiótico	Células EAC, Protozoarios y hongos filamentosos
<i>Fusarium solani</i>	Camptotecina ⁽¹⁵⁾	Anti-tumoral	Modelos animales, Pruebas clínicas, SAR
<i>Biscognauxia Mediterranea</i>	-	-	-
<i>Graphostroma sp</i>	-	-	-

Como muestra la tabla 2 los estudios realizados para comprobar la actividad de algunos compuestos es en cultivos celulares, uno de los ensayos utilizados para comprobar la actividad antiproliferativa es el ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT).

ENSAYO DE MTT

El bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) es un colorante amarillo soluble en agua el cual es capaz de atravesar la membrana plasmática y la membrana mitocondrial, en la mitocondria de células metabólicamente activas el MTT se reduce por

acción de la enzima succinato deshidrogenasa, el MTT es reducido en formazán el cual es insoluble en agua y de color púrpura. El formazán se solubiliza para ser cuantificado por técnica espectrofotométrica, la cantidad de formazán presente en la muestra es directamente proporcional a las células viables del cultivo⁽¹²⁾. Con los resultados de los ensayos de MTT es posible calcular la concentración de inhibición de crecimiento del 50 por ciento de las células (IC₅₀).

II. JUSTIFICACIÓN

El cáncer es una de las enfermedades con mayor incidencia y mortalidad en ésta década, el cual causó 7.6 millones de muertes (cerca del 13% del total) en 2008. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, se estima que para el 2030, en el mundo, las muertes a causa de cáncer aumenten a 13.1 millones. La mayor incidencia en casos de cáncer ocurre en países desarrollados, mientras que la mayor mortalidad a causa de esta enfermedad acontece en países en vías de desarrollo. En la población general mundial los tipos más comunes de cáncer son de pulmón, estómago, hígado, colon, mama y cervicouterino⁽⁸⁾.

En México el cáncer representa la tercer principal causa de defunciones seguida de la diabetes y las enfermedades del corazón con el 11.86%, 14.01% y 29.73% del total de decesos, respectivamente⁽⁹⁾.

Se han aislados compuestos con actividad anticancerígena de algunas plantas y de organismos endófitos de plantas lo que representa la oportunidad de encontrar nuevos compuesto menos agresivos, al venir de una fuente natural. Existe muy poca información sobre hongos endófitos del Tejo mexicano, a pesar de ser una fuente potencial de nuevas sustancias con actividad anticancerosa.

La posibilidad de producir un compuesto anticancerígeno a partir de un organismo representaría un beneficio a nivel industrial ya que es posible desarrollar un modelo de producción más eficiente, es decir, a partir de cultivos celulares y no de extracción y/o síntesis química.

III. HIPÓTESIS

Los hongos endófitos de *Taxus globosa*, contienen al menos un compuesto con actividad anti-proliferativa.

IV. OBJETIVOS

Objetivo General:

- Obtención de un extractos con actividad anti-proliferativa de los hongos *Fusarium sp*, *Graphostroma sp*, *Hypoxylon falciforme* y *Biscognauxia mediterranea* aislados de *Taxus globosa*.

Objetivo Específicos:

- Obtener los extractos por duplicado y analizar su actividad anti-proliferativa en células HeLa.
- Seleccionar uno de los hongos para purificar los compuestos del extracto
- Purificar los compuestos activos del hongo seleccionado por cromatografía

V. MATERIAL Y MÉTODOS

a. Hongos

1. *Fusarium sp.* (SG 01)
2. *Graphostroma sp* (SG 22)
3. *Hypoxyton falciforme* (HA 40)
4. *Biscognauxia mediterranea* (TA 76)

b. Métodos

1. Reactivación

1.1. Material para cultivo de hongos y preparación de inóculo.

Se prepararon 1000 mL de medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) (BD Difco, Sparks MD, USA) y se esterilizaron en autoclave a 15 psi y 121 °C durante 15 min.

El medio, ya esterilizado y a 40 °C, se vació en placas estériles, se utilizaron 6 cajas por cada cepa, es decir, 18 cajas con aproximadamente 20 mL cada una.

Las placas con el medio se dejaron un día a temperatura ambiente para comprobar la ausencia de contaminación.

1.2. Siembra

De la placa que contenía el hongo puro se cortaron círculos de 6 mm de diámetro; con una pipeta Pasteur estéril, con el extremo de mayor diámetro, se tomó uno de los círculos con el otro extremo de la pipeta y se colocó en el centro de una placa con PDA de manera que la zona con crecimiento quede en contacto con el medio. Se sembraron 6 placas de cada cepa.

Las placas se cultivaron a 22 °C en condiciones estáticas hasta obtener crecimiento en $\frac{3}{4}$ partes de la caja.

2. Conservación

2.1. Material para la conservación

Se prepararon 5 crioviales con 1 mL de agua destilada, para cada cepa. Los crioviales y pipetas Pasteur se esterilizaron en autoclave a 15 psi y 121°C durante 15 minutos.

2.2. Conservación

De una de las placas de la reactivación se tomaron círculos con la técnica anterior (ver punto 1.2) y se colocaron 5 círculos dentro de cada criovial, posteriormente se colocaron en refrigeración (3-5 °C).

3. Pruebas de Antiproliferación

3.1. Cultivo de hongos en medio líquido

3.1.1. Material para el cultivo de hongos

Se prepararon 480 mL de medio Czapeck-Dox Broth (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA.) distribuidos de la siguiente manera:

- 24 matraces Erlenmeyer de 125 mL con 15 mL de medio Czapek cada uno
- 4 matraces Erlenmeyer de 250 mL con 30 mL de medio Czapek cada uno

Se esterilizaron en autoclave a 15 psi y 121 °C durante 15 min. Para cada cepa se utilizaron 6 matraces Erlenmeyer de 125 mL y 1 matraz Erlenmeyer de 250 mL

3.1.2. Siembra

De una de las cajas de reactivación se realizó el procedimiento anterior (ver punto 1.2) en 6 placas de medio PDA.

3.1.3. Inoculación

Para cada cepa, se tomó con un bisturí estéril el micelio de las 6 placas (punto 3.1.2.) y se colocaron en 30 mL de medio Czapeck-Dox Broth (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA.) contenidos en un vaso de licuadora estéril y se licuó durante 30 segundos.

Con 5 mL del vaso de licuadora se inoculó un matraz de 125 mL con 15 mL de medio Czapek-Dox Broth y se repitió para los 6 matraces Erlenmeyer de 125 mL (punto 3.1.1.) y se cultivaron a 22 °C y 120 rpm.

3.2. Extracción

El extracto se obtuvo con una solución cloroformo/metanol, diez partes de cloroformo por una de metanol, a razón de 1:2 de volumen de cloroformo/metanol por volumen de cultivo. La mezcla se licuó para homogenizar y posteriormente se centrifugó durante 10 minutos a 10,000 rpm. Una vez centrifugado se recuperó la fase orgánica.

3.3. Secado del extracto

El extracto se secó en un Rotavapor® BUCHI R-210/R-215 a 250 mbar. El extracto seco se recuperó con aproximadamente 5 mL de la mezcla cloroformo/metanol y el producto se pasó a un vial ámbar y se secó con nitrógeno gaseoso.

3.4. Alicuotación del extracto

El extracto seco obtenido de 120 mL de cultivo se resuspendió con 133 µL de cloroformo/metanol por cada 20 mL de cultivo. El extracto disuelto se colocó en 10 viales, cada uno con 50 µL de extracto y cada una de las alícuotas se secaron con nitrógeno gaseoso.

3.5. Análisis de antiproliferación

El protocolo utilizado se describe a continuación:

- Previamente al análisis las micropipetas se calibraron en los volúmenes a utilizar.
- En condiciones de esterilidad, el extracto de la alícuota se disolvió con di-metil-sulfóxido (DMSO) y medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM). Los volúmenes variaron dependiendo de las concentraciones y diluciones de cada extracto (ver anexo A).
- Las placas utilizadas fueron ... con 24 pozos (6 x 4) cada uno con 25,000 células HeLa en 500 μ L de medio DMEM
- Se agregaron 500 μ L de medio DMEM en cada pozo de la placa antes de colocar el extracto.
- En los pozos de la placa se agregó el volumen adecuado de extracto para tener las concentraciones requeridas para cada cepa a analizar (ver anexo A).
- El control de DMSO se colocó en los pozos de la placa utilizando concentraciones no mayores a 0.3 % v/v.
- Se incubó 48 horas a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂.
- Se preparó una solución de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) con una concentración de 0.5mg MTT/mL DMEM y una solución de Isopropanol ácido (3.3 μ L de HCL concentrado/mL de isopropanol) en tubos Falcon. Estas soluciones fueron preparadas el mismo día del ensayo.
- El medio DMEM se retiró de la placa con ayuda de una pipeta Pasteur acoplada a una bomba de vacío.
- Se colocó, en cada pozo, 500 μ L de solución de MTT y se incubó 30 minutos a 37°C en una atmosfera humidificada con 5% de CO₂.
- Concluido el tiempo se retiró la solución de MTT y se colocaron 500 μ L de solución de Isopropanol ácido en cada pozo y se agitó con movimiento orbital.
- El contenido de cada pozo se transfirió a tubos Eppendorff de 1.5 mL y se centrifugó por 2 minutos a 10,000 rpm.
- Se colocaron 100 μ L del sobrenadante de cada tubo en un pozo de una placa de 96 pozos, se midió la absorbancia (A) a 595 nm en lector de placas BIO-RAD Model 680.
- Se Calculó el % de sobrevivencia con la siguiente ecuación:

$$\%sobrevivencia = \frac{A \text{ de células tratadas}}{A \text{ de células con DMSO}} * 100$$

- *Nota: Las placas de 24 pozos con las células HeLa fueron preparadas por el Departamento de Genética, las cuales nos fueron entregadas listas para usar. Cada placa se preparó con 25,000 células por pozo en 500 μ L de medio DMEM suplementados con 10% de suero fetal bovino (SFB) y antibiótico/antimicótico incubadas 24 horas antes del ensayo en atmósfera humidificada con 5% de CO₂ a 37°C.*

4. Cultivo masivo

El cultivo masivo se realizó de un volumen de 15 L por lo que se prepararon un pre-inóculo y un inóculo, el primero de 160 mL, dividido en 8 matraces Erlenmeyer de 125 mL con 20 mL de cultivo cada uno; con este pre-inóculo se inocularon 40 matraces Erlenmeyer de 250 mL con 40 mL de cultivo cada uno siendo de 1.5 L el volumen final del inóculo. En esta etapa el medio Czapek-Dox Broth fue formulado en el laboratorio de acuerdo a la tabla 3

Tabla 3. Composición del medio Czapek-Dox Broth

Compuesto	Concentración (g/L)
Sacarosa	30
Nitrato de sodio	3
Fosfato dipotásico	1
Sulfato de magnesio	0.5
Cloruro de potasio	0.5
Sulfato Ferroso	0.01

Las sales de fosfato dipotásico y sulfato ferroso se esterilizaron por separado y se adicionaron una vez que el medio de cultivo estaba a temperatura ambiente, esto para evitar la precipitación de las sales.

4.1. Reactivación

Material para cultivo de hongos y preparación de inóculo.

Se prepararon 1000 mL de medio de cultivo PDA (BD Difco, Sparks MD, USA) y se esterilizaron en autoclave a 15 psi y 121 °C durante 15 min.

El medio, ya esterilizado y a 40 °C, se vació en placas estériles. Las placas con el medio se dejaron un día a temperatura ambiente para comprobar la ausencia de contaminación.

4.2. Siembra

La siembra se realizó con el procedimiento anterior (punto 1.2). Se sembraron 9 placas debido a que se requiere una placa por cada matraz Erlenmeyer de 125 mL y una extra para asegurar que el inóculo no fuera escaso.

Las placas se cultivaron a 22 °C en condiciones estáticas hasta obtener crecimiento en $\frac{3}{4}$ partes de la caja.

4.3. Preparación del pre-inóculo

Se prepararon 8 matraces Erlenmeyer de 125 mL con 15 mL de medio Czapek cada uno. Se esterilizaron en autoclave a 15 psi y 121 °C durante 15 min.

Se tomó con un bisturí estéril el micelio de las 9 placas (punto 4.2) y se inocularon 45 mL de medio Czapeck-Dox Broth contenidos en un vaso de licuadora estéril y se licuó durante 10 segundos.

Del vaso de licuadora se tomaron 5 mL para inocular un matraz de 125 mL con 15 mL de medio Czapek y se repitió para todos los 8 matraces, se cultivaron a 22 °C y 120 rpm durante 3 días.

4.4. Preparación del inóculo

Para el inóculo se prepararon 40 matraces Erlenmeyer de 250 mL con 33 mL de medio Czapek cada uno. Se esterilizarán en autoclave a 15 psi y 121 °C durante 15 min.

El contenido de los 8 matraces Erlenmeyer de 125 mL, el pre-inoculo, se vació en un vaso de licuadora estéril con 280 mL de medio Czapek-Dox Broth y se licuó durante 10 segundos.

Del vaso de licuadora se tomaron 7 mL para inocular un matraz de 250 mL con 33 mL de medio Czapek y se repitió para los 40 matraces, se cultivaron a 22 °C y 120 rpm durante 3 días.

4.5. Preparación del cultivo masivo

El cultivo masivo se realizó en un garrafón Pyrex® de 5 galones, el garrafón se preparó con 12 L de medio Czapeck-Dox Broth, se le colocaron dos entradas, una de inoculación/venteo y otra de aireación la cual tenía un filtro de 0.22 µm. Se esterilizó en autoclave a 15 psi y 121 °C durante 25 min.

4.6. Inoculación del cultivo masivo

Se vació el contenido de los 40 matraces Erlenmeyer de 250 mL en un vaso de licuadora estéril con 280 mL de medio Czapek-Dox Broth y se licuó durante 20 segundos. El contenido del vaso de licuadora se adicionó por el matraz Erlenmeyer de venteo para inocular el garrafón, además se adicionó 1.5 L de medio Czapek-Dox Broth para enjuagar el matraz de venteo. El garrafón se cultivó a 22 °C en condiciones estáticas con una aireación de 0.3-0.66 vvm durante 7 días.

5. Extracción

Se realizaron cuatro cultivos masivos, dos de cinco litros y dos de quince litros, para los primeros cultivos de cinco litros se contaba con un equipo de extracción liquido-liquido. Los dos cultivos de quince litros no pudieron ser tratados en este equipo, por lo que se extrajeron con otra metodología.

5.1. Columna de extracción L-L

La columna de extracción L-L tiene una capacidad de aproximadamente cuatro litros. La extracción fue un procedimiento en lote, se realizó dos veces por cada extracto. El procedimiento se describe a continuación:

- Se llenó la columna hasta la altura del empaque con la fase ligera, acetato de etilo
- Se hizo pasar la fase pesada, medio de cultivo filtrado con tela, por la cabeza de la columna, con un flujo aproximado de 83 mL/min
- Cuando la interfase entre el extracto y el caldo de cultivo (refinado) se observó en la mitad de la base de la columna, el refinado empezó a recuperarse. La interfase se mantuvo durante toda la extracción en ese punto.

- Después de recuperar todo el refinado, el extracto se recolectó por la base de la columna.
- Posteriormente el extracto se secó en rotavapor

5.2. Extracción por mezclado con solvente

El otro método de extracción se hizo mezclando el caldo de cultivo y/o el micelio con el solvente de extracción, para mejorar el contacto entre las fases, se licuó en una licuadora OSTER® a razón de 2:1 de caldo y/o micelio por solvente.

La mezcla se dejó reposar por aproximadamente 24 horas para que las fases se separaran.

El extracto se recuperó con una bomba peristáltica y se secó en rotavapor

6. Purificación

La purificación consta de dos cromatografías. La cromatografía en capa fina se realizó primero para la selección del eluyente y para verificar la similitud de los extractos. La cromatografía en columna se utilizó para obtener fracciones de los extractos.

6.1. Cromatografía en capa fina (CCF)

6.1.1. Preparación de la muestra

Se tomó una muestra de cada extracto y se disolvió cada uno en 1 mL de acetona

6.1.2. Preparación del eluyente

Se prepararon diferentes mezclas de solventes para modificar la polaridad del eluyente, las mezclas se prepararon el mismo día que se utilizaron para evitar que la composición de las mezclas se modificara.

Los solventes o mezclas de estos que se utilizaron fueron los siguientes:

- Hexanos
- Metanol
- Cloroformo
- Acetato de etilo
- Cloroformo/metanol proporción 9:1
- Cloroformo/metanol/hexanos proporción 9:1:0.5, 10:1:1 y 9:1:1

6.1.3. CCF

Se cortaron placas de sílice de aproximadamente 2 cm de largo y 5 cm de alto, marcando en los extremos una línea a 0.5 cm del borde.

Con un capilar se tomó una muestra del extracto y se colocó en la línea inferior de la placa de sílice, para evitar que la muestra estuviera diluida este paso se realizó 3 veces.

Una vez que la muestra estuvo seca, la placa se colocó en una cámara saturada con el eluyente a probar y se corrió hasta que el eluyente llegó a la marca superior de la placa de sílice.

Posteriormente se dejó secar y se reveló en una cámara con vapores yodo por 5 segundos, después, las placas se observaron bajo luz UV de onda corta.

6.2. Cromatografía en columna (CC)

El gel de sílice requerido para la masa total de los extractos se calculó con una relación de 20 g de gel de sílice por cada gramo de extracto (Ver anexo B)

6.2.1. Carga de la columna

La fase estacionaria utilizada en la columna fue gel de sílice el cual se cargó en la columna con hexano hasta ocupar tres cuartas partes de la columna, para evitar que quedara aire entre la fase estacionaria se pasaron cinco veces 250 mL de hexano a través de la columna. La columna se niveló para que el empaque quedara uniforme en la superficie y al correr la muestra fuera igual en toda la columna.

6.2.2. Preparación de la muestra

Los extractos líquidos se mezclaron con 4 g de gel de sílice hasta obtener un polvo húmedo y los extractos secos se resuspendieron con acetona y se les agregó 2 g de gel de sílice, posteriormente se secaron con nitrógeno gaseoso y se les agregó 2 g más.

6.2.3. CC

A la columna ya cargada se le adicionó el gel de sílice con la muestra de manera que la superficie quedó uniforme. Una vez cargada la columna con la muestra, se empezó a adicionar el eluyente seleccionado en la CCF y a recolectar las fracciones, cada una de 8 mL.

De las fracciones obtenidas se hicieron CCF y de acuerdo a la similitud de las placas se juntaron las fracciones y se secaron en rotavapor.

Una de las ventajas de utilizar la CC es que se puede cambiar el eluyente cuando el utilizado ya no arrastre los compuestos en la columna, aumentando la polaridad.

VI. RESULTADOS

a. Morfología macroscópica

Los hongos utilizados en el proyecto fueron aislados del *Taxus globosa* y conservados en refrigeración y a partir de estos se realizó la reactivación. Las figuras 1 a 4 muestran la morfología macroscópica de los 4 hongos utilizados en este trabajo.

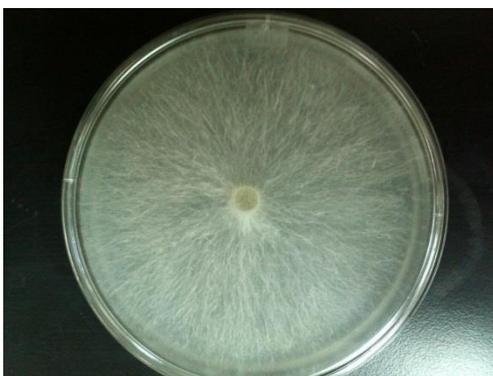


Figura 1. Cultivo en placa de PDA de *Biscognauxia mediterranea*, 5 días de incubación

La *Biscognauxia mediterranea* tiene coloración crema con presencia de micelio fino y con poca elevación, borde regular.

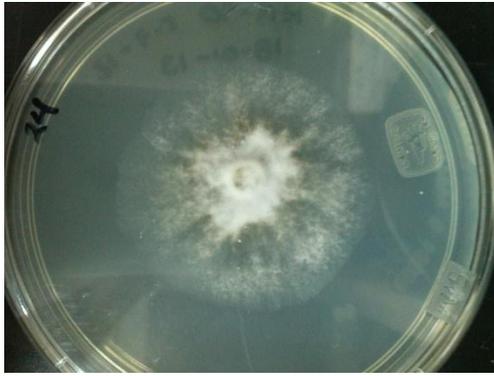


Figura 2. Cultivo en placa de PDA de *Hypoxylon falciforme*, 6 días de incubación

La cepa de *Hypoxylon falciforme* presenta un micelio algodonoso con poca elevación y de color blanco, por la parte posterior de la placa la coloración es verde oscuro el crecimiento es uniforme con bordes regulares.



Figura 3. Cultivo en placa de PDA de *Graphostroma sp.*, 8 días de incubación

La *Graphostroma sp.* tiene un micelio abundante y algodonoso de color grisáceo con elevación, la parte posterior de la placa es de color negro los bordes son irregulares.



Figura 4. Cultivo en placa de PDA de *Fusarium sp.*, 8 días de incubación

Fusarium sp. tiene un micelio abundante con elevación media de color amarillo en los extremos y rosa en el centro, la parte posterior de la placa muestra un color rosa intenso.

- b. Análisis de la actividad antiproliferativa en células HeLa, de los extractos de los cultivos de los hongos *Biscognauxia mediterranea*, *Hypoxylon falciforme*, *Graphostroma sp.* y *Fusarium sp.*

Se obtuvieron dos extractos de los cultivos de cada uno de los 4 hongos, uno por cada réplica del cultivo. De los extractos crudos obtenidos de cada cepa se realizaron estudios de antiproliferación en células HeLa para calcular la IC_{50} de cada extracto. En un inicio, se probaron 3 concentraciones diferentes en base a estudios realizados previamente (ver antecedentes del grupo de trabajo), se

probaron 6 concentraciones de los extractos de cada hongo. Los resultados, por cada cepa, se muestran a continuación.

i. *Biscognauxia mediterranea* (TA 76)

En reportes anteriores del grupo de trabajo, se encontró que el extracto de *Biscognauxia Mediterranea* tiene una IC₅₀ de 0.6 % v/v, por lo que las concentraciones probadas en este trabajo fueron: 0.5 % v/v, 0.6 % v/v y 0.7 % v/v.

Tabla 4. Análisis de antiproliferación de los extractos de *Biscognauxia mediterranea* en el intervalo de concentraciones de 0.5 % v/v hasta 0.7 % v/v

TA 76 R1 y R2	Absorbancia	% supervivencia
Control	0.255 ± 0.023	100
DMSO	0.275 ± 0.046	100
0.5	0.200 ± 0.013	73.058
0.5	0.206 ± 0.011	75.121
0.6	0.201 ± 0.014	73.301
0.6	0.203 ± 0.018	73.908
0.7	0.208 ± 0.005	75.850
0.7	0.212 ± 0.017	77.063

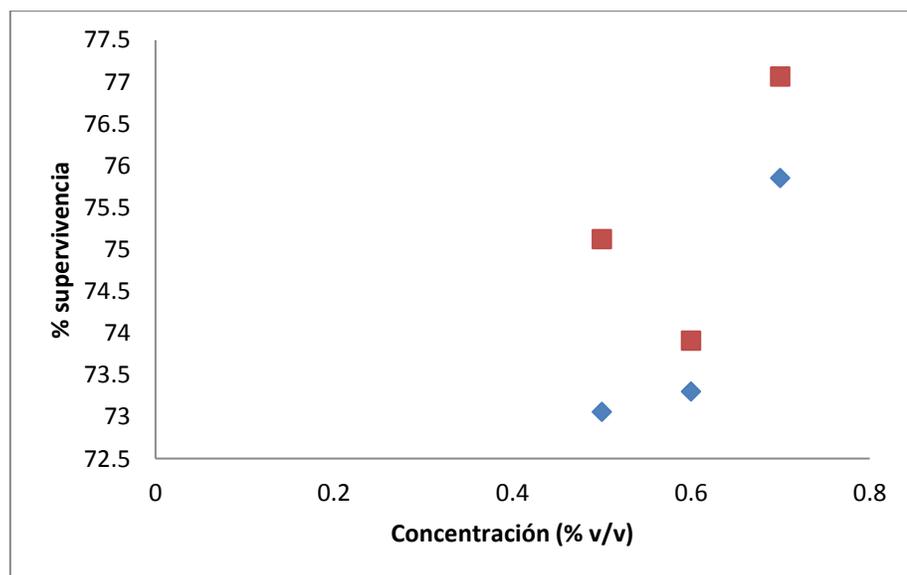


Figura 5. Gráfica de % de supervivencia de células HeLa vs concentración de los extractos de *Biscognauxia mediterranea*

Como se muestra en la tabla 4 y la figura 5 los porcentajes de supervivencia fueron mayores a 73% y no se pudo calcular la IC₅₀ por lo que el intervalo de concentraciones se amplió hasta de 0.3 % v/v hasta 1.2 % v/v.

Tabla 5. Análisis de antiproliferación del extracto de Biscognauxia mediterranea, primera réplica, en el intervalo de concentraciones de 0.3 % v/v hasta 1.2 % v/v

TA 76 R1	Absorbancia	% supervivencia
Control	0.511 ± 0.009	100
DMSO	0.495 ± 0.054	100
0.3	0.443 ± 0.037	89.495
0.5	0.423 ± 0.057	85.455
0.7	0.403 ± 0.045	81.347
0.9	0.404 ± 0.033	81.616
1	0.420 ± 0.044	84.781
1.2	0.484 ± 0.036	97.778

Tabla 6. Análisis de antiproliferación del extracto de Biscognauxia mediterranea, segunda réplica, en el intervalo de concentraciones de 0.3 % v/v hasta 1.2 % v/v

TA 76 R2	Absorbancia	% supervivencia
Control	0.524 ± 0.020	100
DMSO	0.471 ± 0.061	100
0.3	0.469 ± 0.067	99.434
0.5	0.459 ± 0.044	97.454
0.7	0.418 ± 0.051	88.685
0.9	0.444 ± 0.060	94.130
1	0.430 ± 0.076	91.231
1.2	0.500 ± 0.078	106.153

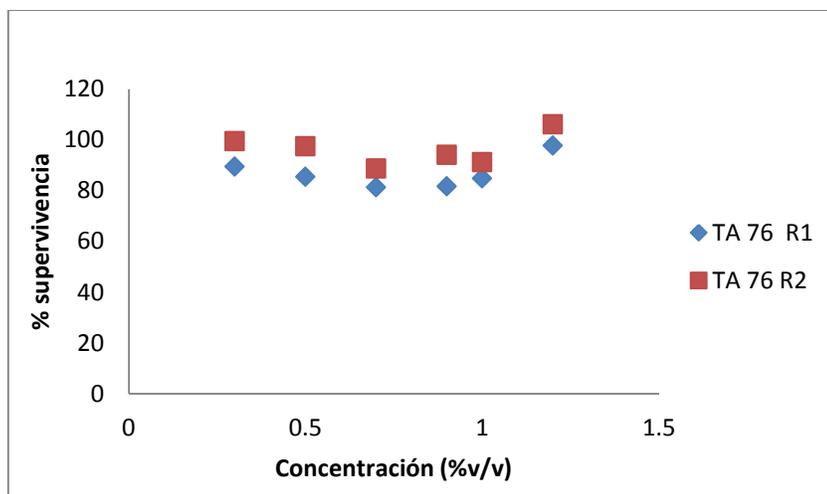


Figura 6. Gráfica de % de supervivencia de células HeLa vs concentración de los extractos de *Biscognauxia mediterranea*, réplica 1 y 2.

Los resultados de ambos análisis de antiproliferación demostraron que los extractos *Biscognauxia mediterranea* tiene actividad antiproliferativa baja en células HeLa en las concentraciones de 0.3% v/v hasta 1.2% v/v ya que en ninguno de los análisis se obtuvo un porcentaje de supervivencia menor a 73%.

Al comparar los resultados de antiproliferación previamente obtenidos en el grupo de trabajo con el ahora descrito demostraron que los resultados obtenidos por el grupo de trabajo se vieron influenciados por la concentración de DMSO, ya que determinaron una IC_{50} de 0.6 % v/v pero las concentraciones de DMSO utilizadas fueron mayores a 0.3 % v/v.

ii. *Hypoxylon falciforme* (HA 40)

El grupo de trabajo reportó una IC_{50} de 0.6 % v/v para la cepa de HA 40 por lo que en el primer análisis de antiproliferación se probó hasta esa concentración.

Tabla 7. Análisis de antiproliferación de los extractos de *Hypoxylon falciforme* en el intervalo de concentraciones de 0.3 % v/v hasta 0.6 % v/v

HA 40 R1 y R2	Absorbancia	% supervivencia
Control	0.298 ± 0.039	100
DMSO	0.254 ± 0.013	100
0.3	0.255 ± 0.022	100.394
0.3	0.234 ± 0.022	92.257
0.5	0.223 ± 0.005	87.664
0.5	0.221 ± 0.055	86.877
0.6	0.219 ± 0.006	86.220
0.6	0.186 ± 0.017	73.360

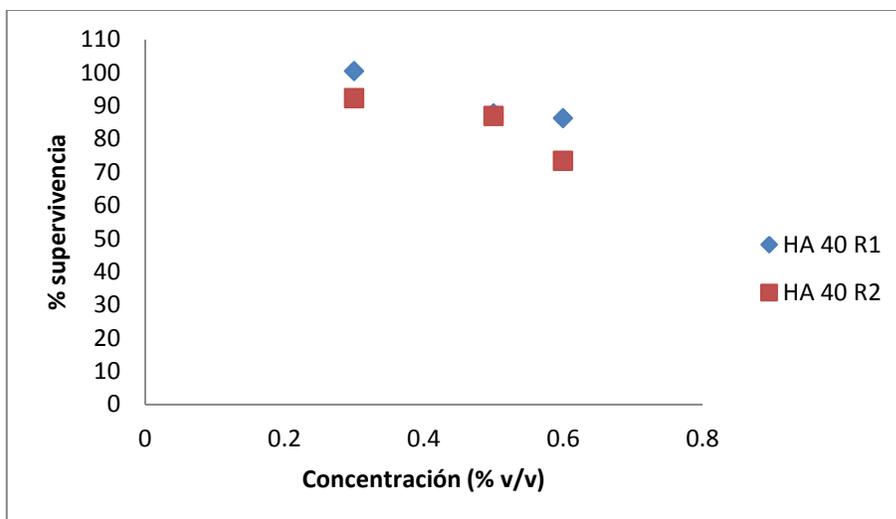


Figura 7. Gráfica de % de supervivencia de células HeLa vs concentración de los extractos de *Hypoxylon falciforme*, réplica 1 y 2.

Como se muestra en la figura 7 y en la tabla 7, los extractos no alcanzaron a inducir porcentajes de supervivencia menores a 73 % por lo que se aumentó la concentración en el análisis hasta 0.8 % v/v. Se probaron ambos extractos de las réplicas, sin embargo, en la segunda réplica se probaron concentraciones más altas, 3 veces el volumen de las últimas concentraciones de manera que las concentraciones 0.75 % v/v y 0.8 v/v se les adicionó un volumen que equivaldría a 2.25 % v/v y 2.4 % v/v del extracto, respectivamente, la concentración del DMSO también aumento pasando de 0.18 % v/v y 0.2 % v/v a 0.56 % v/v y 0.6 %v/v.

Tabla 8. Análisis de antiproliferación del extracto de *Hypoxylon falciforme*, réplica 1, en el intervalo de concentraciones de 0.3 % v/v hasta 0.8 % v/v

HA 40 R1	Absorbancia	% supervivencia
Control	0.334 ± 0.040	100
DMSO	0.377 ± 0.020	100
0.3	0.305 ± 0.018	80.742
0.5	0.287 ± 0.014	75.972
0.6	0.229 ± 0.037	60.777
0.7	0.255 ± 0.033	67.668
0.75	0.247 ± 0.040	65.459
0.8	0.299 ± 0.001	79.108

Tabla 9. Análisis de antiproliferación del extracto de *Hypoxylon falciforme*, réplica 2, en el intervalo de concentraciones de 0.3 % v/v hasta 2.4 % v/v

HA 40 R1	Absorbancia	% supervivencia
Control	0.504 ± 0.047	100
DMSO	0.383 ± 0.019	100
0.3	0.318 ± 0.003	82.96
0.5	0.260 ± 0.037	67.74
2.25	0.049 ± 0.004	12.65
2.4	0.046 ± 0.00	12.09

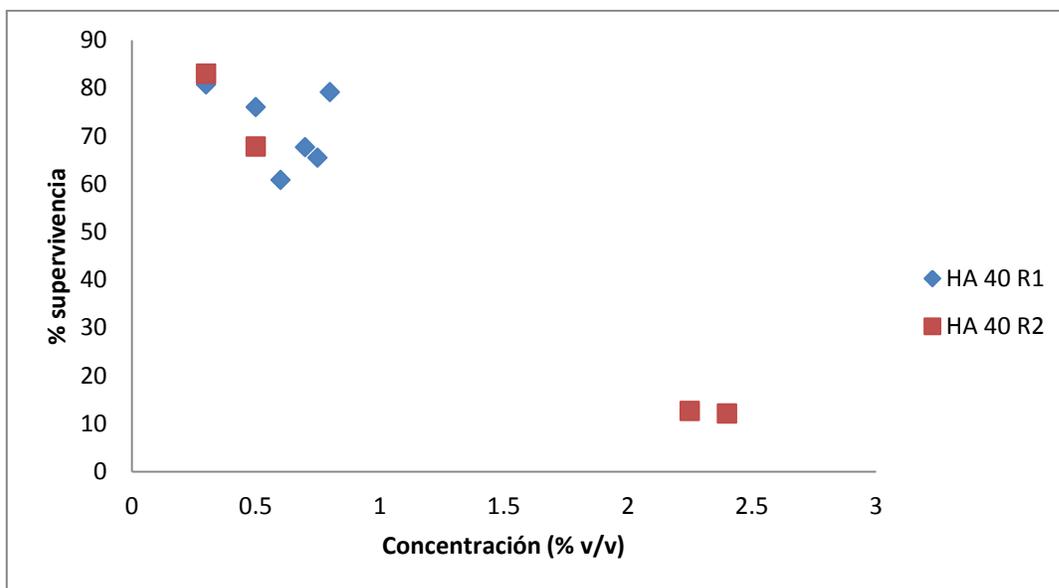


Figura 8. Gráfica de % de supervivencia vs concentración del extracto de *Hypoxylon falciforme*, réplica 1 y 2, segundo Análisis de antiproliferación

Como se observa en la figura 8 la réplica 1 del extracto del cultivo de *Hypoxylon falciforme* no alcanzó la IC₅₀ en el intervalo de concentraciones probadas, sin embargo, tiene una actividad antiproliferativa significativa por lo que se realizó un tercer análisis de antiproliferación.

El intervalo de concentraciones se estableció de acuerdo a los resultados de la réplica 2 ya que, como se muestra en la figura 8, es posible alcanzar % de supervivencia menores a altas concentraciones.

Tabla 10. Análisis de antiproliferación del extracto de *Hypoxylon falciforme* en el intervalo de concentraciones de 0.3 % v/v hasta 2 % v/v

HA 40 R1	Absorbancia	% supervivencia
Control	0.520 ± 0.039	100
DMSO	0.524 ± 0.060	100
0.3	0.543 ± 0.048	103.497
0.6	0.514 ± 0.022	97.966
0.9	0.477 ± 0.055	90.973
1.2	0.421 ± 0.160	80.356
1.5	0.494 ± 0.036	94.278
2	0.467 ± 0.011	89.129

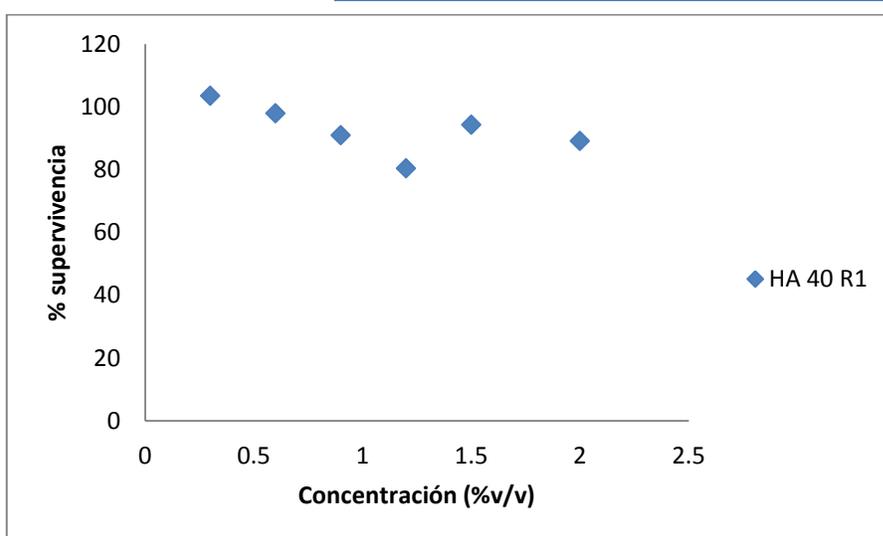


Figura 9. Gráfica de % de supervivencia vs concentración del extracto de *Hypoxylon falciforme*, réplica 1, 3° Análisis de antiproliferación

En el tercer análisis de antiproliferación el extracto de la réplica 1 no alcanzó el 50 % de supervivencia, a pesar de probar concentraciones altas, similares a las probadas para la réplica 2 en el segundo análisis de antiproliferación, en el cual se alcanzó un porcentaje de supervivencia de 12 %. Esto demuestra que los resultados de porcentaje de supervivencia se vieron influenciados por el DMSO el cual aumento significativamente de concentración.

iii. *Graphostroma sp* (SG 22)

Para los extractos del hongo SG 22 se conocía, en reportes anteriores del grupo de trabajo, una IC₅₀ de 0.175 % v/v por lo que se estableció un intervalo de 0.1 % v/v hasta 0.3 % v/v.

Tabla 11. Análisis de antiproliferación de los extractos de *Graphostroma sp* en el intervalo de concentraciones de 0.1 % v/v hasta 0.3 % v/v de ambas réplicas

SG 22 R1 y R2	Absorbancia	% supervivencia
Control	0.429 ± 0.041	100
DMSO	0.464 ± 0.017	100
0.1	0.404 ± 0.043	107.155
0.1	0.361 ± 0.003	95.583
0.2	0.253 ± 0.020	67.138
0.2	0.253 ± 0.031	67.138
0.3	0.149 ± 0.053	39.399
0.3	0.203 ± 0.036	53.887

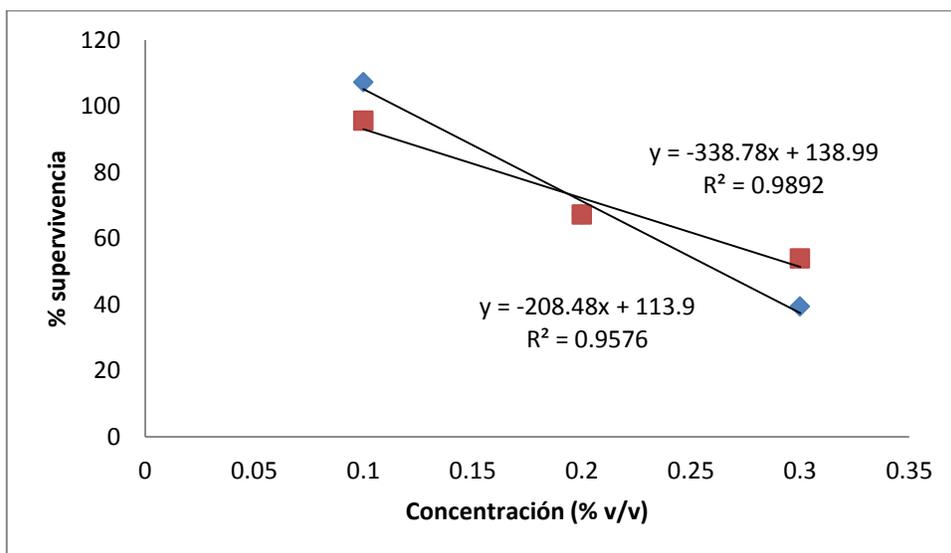


Figura 10. Gráfica de % de supervivencia vs concentración de los extractos de *Graphostroma sp*, réplica 1 y 2.

Los extractos de *Graphostroma sp*. muestran buena actividad antiproliferativa y es posible calcular la IC₅₀ de cada extracto, además se puede observar como la primer réplica del extracto es más activa que la segunda (figura 10).

En base a estos resultados para el segundo análisis de antiproliferación se amplió el intervalo de concentraciones desde 0.1 % v/v hasta 0.45 % v/v y se probaron 6 concentraciones.

Tabla 12 Análisis de antiproliferación del extracto de Graphostroma sp, réplica 1, en el intervalo de concentraciones de 0.1 % v/v hasta 0.45 % v/v

SG 22 R1	Absorbancia	% supervivencia
Control	0.534 ± 0.034	100
DMSO	0.591 ± 0.042	100
0.1	0.440 ± 0.072	74.549
0.2	0.297 ± 0.032	50.226
0.25	0.198 ± 0.039	33.465
0.3	0.091 ± 0.014	15.463
0.35	0.063 ± 0.003	10.666
0.45	0.052 ± 0.004	8.804

Tabla 13. Análisis de antiproliferación del extracto de Graphostroma sp, réplica 2, en el intervalo de concentraciones de 0.1 % v/v hasta 0.45 % v/v

SG 22 R2	Absorbancia	% supervivencia
Control	0.367 ± 0.032	100
DMSO	0.382 ± 0.015	100
0.2	0.309 ± 0.030	80.759
0.25	0.298 ± 0.034	77.923
0.3	0.269 ± 0.060	70.419
0.35	0.235 ± 0.029	61.431
0.45	0.189 ± 0.017	49.564

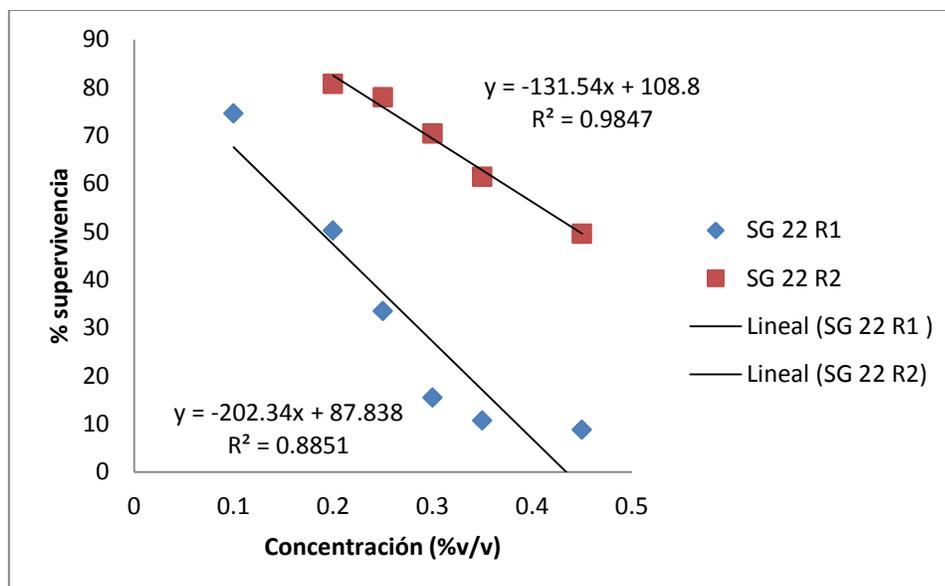


Figura 11. Gráfica de % de supervivencia vs concentración de los extractos de *Graphostroma sp.*, réplica 1 y 2, 2° Análisis de antiproliferación

El segundo análisis de antiproliferación de *Graphostroma sp.* demostró que la segunda réplica es menos activa que la primera, sin embargo, en ambas se alcanzó la IC_{50} y se calculó de acuerdo a la ecuación de la recta de los datos y se calculó de la siguiente manera:

$$IC_{50} = \frac{50\% - \text{ordenada al origen}}{\text{pendiente}}$$

De acuerdo a la ecuación la IC_{50} de la primera réplica fue de 0.3 % v/v y de la segunda réplica fue de 0.26 % v/v.

iv. *Fusarium sp.* (SG 01)

Los extractos de *Fusarium sp.* han demostrado tener una actividad elevada ya que estudios anteriores realizados en el grupo de trabajo han situado la IC_{50} en 0.00035 % v/v, para fines prácticos, el primer análisis de antiproliferación de SG01 se realizó en el intervalo de concentraciones de 0.003 % v/v hasta 0.3 % v/v

Tabla 14. Análisis de antiproliferación de los extractos de *Fusarium sp.* en el intervalo de concentraciones de 0.003 % v/v hasta 0.3 % v/v

SG 01 R1 y R2	Absorbancia	% supervivencia
Control	0.418 ± 0.040	100
DMSO	0.356 ± 0.038	100

0.003	0.040 ± 0.002	10.601
0.003	0.051 ± 0.006	13.516
0.03	0.043 ± 0.005	11.484
0.03	0.043 ± 0.008	11.307
0.3	0.042 ± 0.003	11.219
0.3	0.040 ± 0.002	10.512

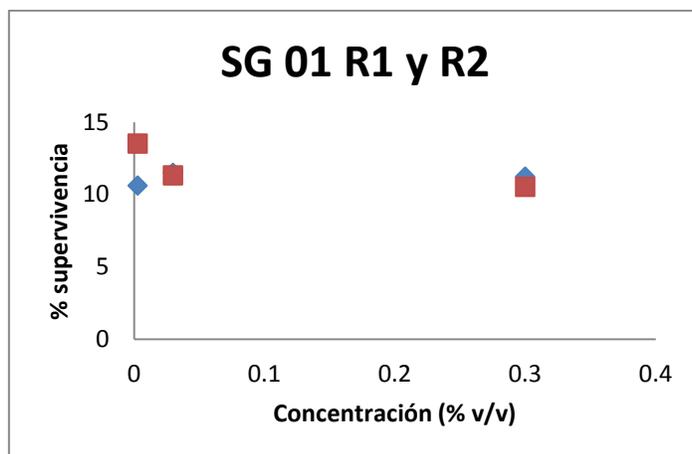


Figura 12. Gráfica de % de supervivencia vs concentración de los extractos de *Fusarium sp*, réplica 1 y 2

Como muestra la figura 12, las concentraciones probadas alcanzan porcentajes de supervivencia muy por debajo de la IC₅₀ por lo que para el segundo análisis el intervalo de concentraciones se disminuyó y fue de 0.00003 % v/v hasta 0.0003% v/v.

Tabla 15. Análisis de antiproliferación de los extractos de *Fusarium sp* en el intervalo de concentraciones de 0.00003 % v/v hasta 0.0003 % v/v

SG 01 R1 y R2	Absorbancia	% supervivencia
Control	0.727 ± 0.071	100
0.00003	0.697 ± 0.014	95.963
0.00003	0.421 ± 0.036	57.890
0.00015	0.320 ± 0.022	44.037
0.00015	0.085 ± 0.005	11.697
0.0002	0.191 ± 0.016	26.284
0.0003	0.075 ± 0.002	10.367
0.0003	0.102 ± 0.022	14.083

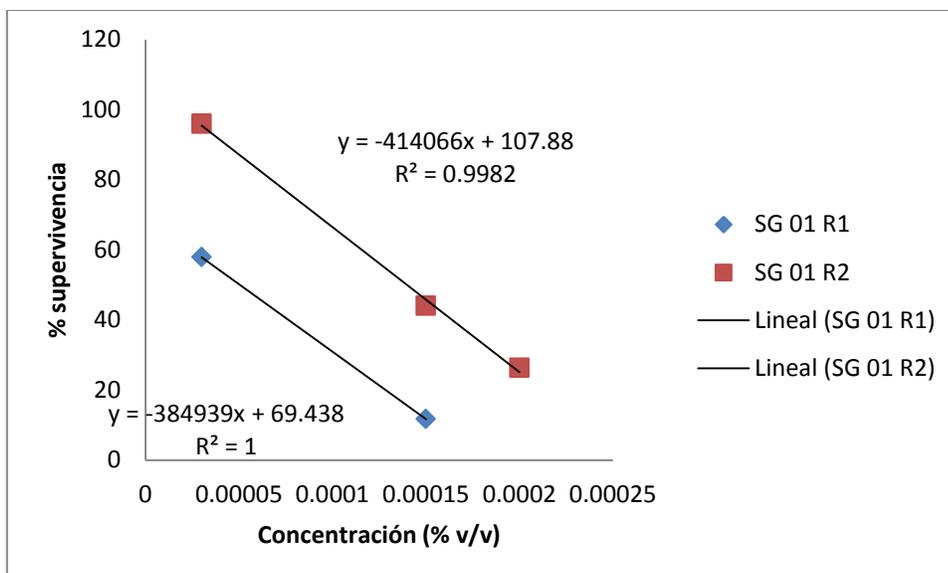


Figura 13. Gráfica de % de supervivencia vs concentración de los extractos de *Fusarium sp.*, réplica 1 y 2, segundo análisis de antiproliferación.

Con el intervalo de concentraciones utilizado en el segundo análisis es posible calcular la IC_{50} de cada extracto de *Fusarium sp.* como muestra la figura 13, sin embargo para tener una mejor aproximación es necesario realizar una curva de 5 puntos mínimo, de manera que se realizó un tercer análisis antiproliferación estableciendo el intervalo de concentraciones de 0.000024 % v/v y 0.0002 aunque el segundo extracto de *Fusarium sp.* es notablemente más activo que el primero (figura 13).

Tabla 16. Análisis de antiproliferación del extracto de *Fusarium sp.*, réplica 2, en el intervalo de concentraciones de 0.000024 % v/v hasta 0.0002 % v/v

SG 01 R2	Absorbancia	% supervivencia
Control	0.469 ± 0.067	100
0.000024	0.428 ± 0.049	91.394
0.00003	0.373 ± 0.046	79.587
0.00004	0.254 ± 0.075	54.125
0.00005	0.116 ± 0.025	24.680
0.00008	0.089 ± 0.009	19.061
0.0001	0.084 ± 0.020	17.923
0.0002	0.070 ± 0.013	14.936

Tabla 17. Análisis de antiproliferación del extracto de *Fusarium sp*, réplica 1, en el intervalo de concentraciones de 0.000024 % v/v hasta 0.0002 % v/v

SG 01 R1	Absorbancia	% supervivencia
Control	0.551 ± 0.032	100
0.000024	0.543 ± 0.055	98.608
0.00005	0.539 ± 0.018	97.821
0.0001	0.463 ± 0.027	84.140
0.00015	0.451 ± 0.046	81.901
0.00016	0.483 ± 0.017	87.712
0.00018	0.387 ± 0.067	70.278
0.0002	0.364 ± 0.199	66.041

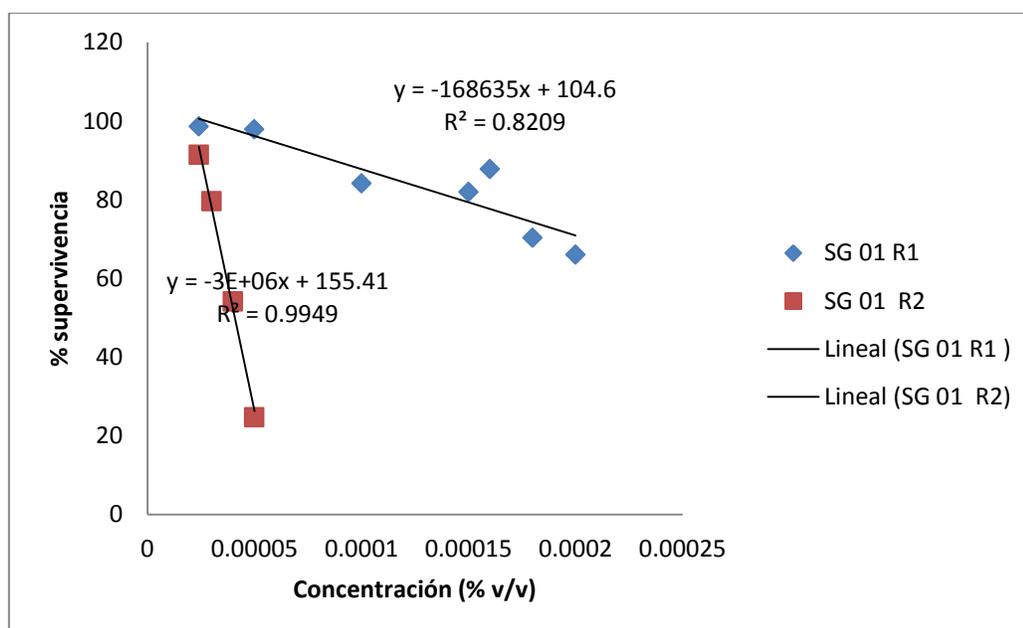


Figura 14. Gráfica de % de supervivencia vs concentración de los extractos de *Fusarium sp*, réplica 1 y 2, tercer análisis

Con la ecuación de la línea recta del tercer análisis se calculó la IC_{50} de cada extracto dando como resultado 0.00032 % v/v para la primera réplica y 0.00005 % v/v para la segunda réplica. La diferencia de actividad antiproliferativa entre los extractos puede deberse a las condiciones y al tiempo de cultivo ya que el compuesto activo puede ser un metabolito secundario y la cantidad que produce el hongo está relacionada con el tiempo de cultivo y la fase de crecimiento en la que se encuentra. Otro factor importante a considerar es la preparación del inóculo.

Tabla 18. Comparación de la IC₅₀ calculados y reportados anteriormente de las cepas SG 01, SG 22, LA 40 y TA 76

Cepa	IC ₅₀	Intervalo de concentraciones del análisis de antiproliferación	IC ₅₀ reportado por el grupo
SG 01 Réplica 1	0.00032 % v/v	0.00003-0.0003 % v/v	0.00035 %v/v
SG 01 Réplica 2	0.00005 % v/v	0.00003-0.0003 % v/v	
SG 22 Réplica 1	0.3 % v/v	0.1 -0.45 %v/v	0.175 %v/v
SG 22 Réplica 2	0.26 % v/v	0.1 -0.45 %v/v	
LA 40 Réplica 1	4.83% v/v	0.3 -5 %v/v	0.6 %v/v
LA 40 Réplica 2	2.72% v/v	0.3 -7 %v/v	
TA 76 Réplica 1	-	0.3 -6 %v/v	0.6 %v/v
TA 76 Réplica 2	-	0.3 -6 %v/v	

En base a los resultados de este primer análisis de antiproliferación se seleccionó la cepa que se iba a llevar hasta cultivo masivo y purificación de los compuestos de su extracto. El primer criterio para la selección fue la actividad de los extractos. Como muestra la tabla 18, los extractos más potentes fueron los de *Fusarium sp.* y *Graphostroma sp.* el otro criterio fue la posibilidad de encontrar nuevos compuestos. Debido a que no existen estudios sobre *Graphostroma sp.*, esta fue la cepa utilizada en las siguientes etapas.

c. Cultivo Masivo

El cultivo masivo se realizó en 4 cultivos diferentes. En la tabla 19 se muestra las condiciones de cada uno de ellos, así como el peso seco final de cada extracto. Los extractos se realizaron con diferentes procedimientos de extracción.

Tabla 19. Condiciones de los diferentes cultivos y la masa final obtenida de cada cultivo.

Cultivo	Condiciones	Tiempo de cultivo	Masa de extracto obtenida	Método de extracción
Reactor	Flujo de aire: 1.5 L/min Agitación: 5 m Temperatura: no se reguló	8 días	Micelio: 0.53626 g	Licuado con solvente
			Caldo: 0.5229 g	Columna de extracción
Garrafón de 5L	Flujo de aire 5 L/min Agitación: no se reguló Temperatura: 22° C ± 2°C	7 días	0.3641 g	Licuado con solvente y columna
1°Garrafón de 15 L	Flujo de aire 5-7 L/min Agitación: no se reguló Temperatura: 22° C ± 2°C	7 días	Micelio: 0.96743 g	Licuado con solvente
			Caldo: 0.55204 g	Columna de extracción
2°Garrafón de 15 L	Flujo de aire 5-7 L/min Agitación: no se reguló Temperatura: 22° C ± 2°C	7 días	Micelio: 0.23493 g	Licuado con solvente
			Caldo: 2.49373 g	Licuado con solvente

d. Cromatografía

La CCF se realizó para elegir el solvente a utilizar en la CC por lo que se utilizó solo uno de los extractos, el obtenido del micelio del hongo del reactor de 5 litros. Los resultados de los diferentes solventes que se probaron fueron:

- Hexanos: No hubo separación de los componentes del extracto, toda la muestra se quedó en el punto de aplicación.
- Metanol: La muestra se separó en dos bandas diferentes, cerca del frente de eluyente.
- Cloroformo: Presento separación de componentes, tres bandas difusas, la mayoría de la muestra permaneció en el punto de aplicación
- Acetato de etilo: No mostro separación, toda la muestra corrió uniformemente por la placa.
- Cloroformo/metanol (proporción 9:1): Con esta mezcla se obtuvo mejor separación, cinco bandas, sin embargo debido a la cercanía de las bandas, se decidió disminuir la polaridad del eluyente.

- Cloroformo/metanol/hexanos (proporción 9:1:0.5, 10:1:1 y 9:1:1): De esta mezcla la proporción que mostro mejor separación fue 9:1:1 la cual se utilizó para realizar la CC.

De la CC se hicieron CCF a cada una de las fracciones de 8 mL obtenidas y de acuerdo a los resultados de esta se juntaron en un total de 12 fracciones diferentes (ver anexo C), las cuales se eluyeron por un periodo de seis días. Después de 7 fracciones, se cambió el eluyente por acetona, con el cual se lograron obtener 3 fracciones más. Es posible que los compuestos de los extractos reaccionaran con el gel de sílice debido a que se quedó pigmentado. El gel de sílice de la columna se recuperó en 4 secciones diferentes, de acuerdo a su coloración, y posteriormente se sumergieron en metanol, se recuperaron otras 2 fracciones de la columna.

Tabla 20. Masa de las fracciones obtenidas de la CC

Fracción	Masa de extracto (g)	Eluyente
1	2.66636	Cloroformo/Metanol/Hexano
2	1.15218	Cloroformo/Metanol/Hexano
3	0.096479	Cloroformo/Metanol/Hexano
4	0.07291	Cloroformo/Metanol/Hexano
5	0.047319	Cloroformo/Metanol/Hexano
6	0.61005	Cloroformo/Metanol/Hexano
7	0.11653	Cloroformo/Metanol/Hexano
8	0.47158	Acetona
9	0.02642	Acetona
10	0.01453	Acetona
11	0.04161	Metanol
12	0.2721	Metanol

A las fracciones obtenidas se les realizó de nuevo el análisis de antiproliferación para verificar en cuál de ellas presenta buena actividad antiproliferativa para continuar la purificación de los compuestos en dicha fracción.

- e. Análisis de la actividad antiproliferativa en células HeLa de las fracciones del extracto del cultivo masivo del hongo *Graphostroma sp.*

Para el segundo análisis de antiproliferación se recalculó la IC_{50} obtenido en primer análisis del extracto crudo de *Graphostroma sp.* para que tener la concentración en % w/v. Debido a que no se tiene el peso seco de los primeros extractos se realizó con una base de cálculo con el cultivo masivo, se estimó el equivalente a matraces para cada cultivo y posteriormente los mg de extracto producidos por matraz, ya que por cada matraz se agregaron 133 μ L de solvente para la alicuotación se pudo hacer un cálculo aproximado de la IC_{50} y en base a este se realizó el segundo análisis de antiproliferación.

Tabla 21. Cálculo aproximado de la IC₅₀ de cada cultivo en base a la primera extracción realizada

Cultivo	Matraces	Extracto por matraz (mg)	Extracto por alícuota (mg)	IC ₅₀ (% w/v)
Reactor	5000	1.456	0.548	3.116
Garrafón de 5 L	5000	2.026	0.762	4.335
1° Garrafón de 15 L	15000	4.237	1.593	9.065
2° Garrafón de 15 L	15000	3.638	1.368	7.785
Sumatoria	40000	2.836	1.066	6.068

En base a las aproximaciones a la IC₅₀ de la tabla 21 el intervalo de concentraciones fue de 1 % w/v hasta 14 % w/v para que todas las IC₅₀ de la tabla 21 sean probadas.

i. Fracción 1

La fracción 1 fue de la que se obtuvo mayor masa (tabla 20) tenía una consistencia aceitosa y en la CCF parecía estar pura, debido a que solo mostraba una banda, sin embargo, la actividad antiproliferativa no fue significativa; no fue posible calcular la IC₅₀.

Tabla 22. Análisis de antiproliferación de la primera fracción obtenida en la CC

Fracción 1	Absorbancia	% supervivencia
Control	0.474 ± 0.026	100
DMSO	0.453 ± 0.076	100
1	0.407 ± 0.022	89.78
4	0.212 ± 0.039	46.84
7	0.343 ± 0.006	75.74
10	0.362 ± 0.034	79.93
14	0.398 ± 0.027	87.72

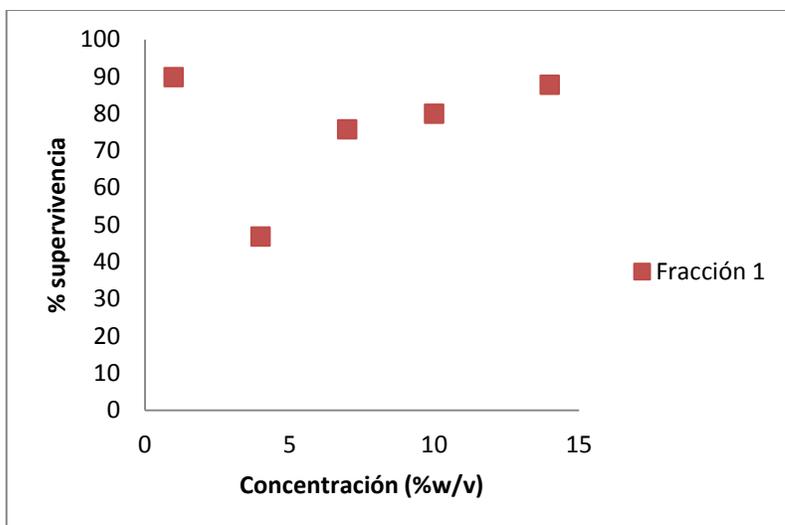


Figura 15. Gráfica de % de supervivencia vs concentración de la fracción 1

ii. Fracción 2

La segunda fracción, también de consistencia aceitosa, mostro una alta actividad antiproliferativa siendo la IC_{50} menor a 1 % w/v, no fue posible calcular la IC_{50} exacta ya que el coeficiente de correlación es de 0.69 por lo que la concentración calculada con la ecuación de la recta es negativa. Para calcular la IC_{50} exacta es necesario hacer otro análisis de antiproliferación con concentraciones menores y más puntos. La CCF mostro que existen por lo menos tres compuesto diferentes en la fracción.

Tabla 23. Análisis de antiproliferación de la segunda fracción obtenida en la CC

Fracción 2	Absorbancia	% supervivencia
Control	1.077 ± 0.275	100
DMSO	0.513 ± 0.055	100
1	0.267 ± 0.030	51.98
7	0.054 ± 0.006	10.46
14	0.59 ± 0.011	11.5

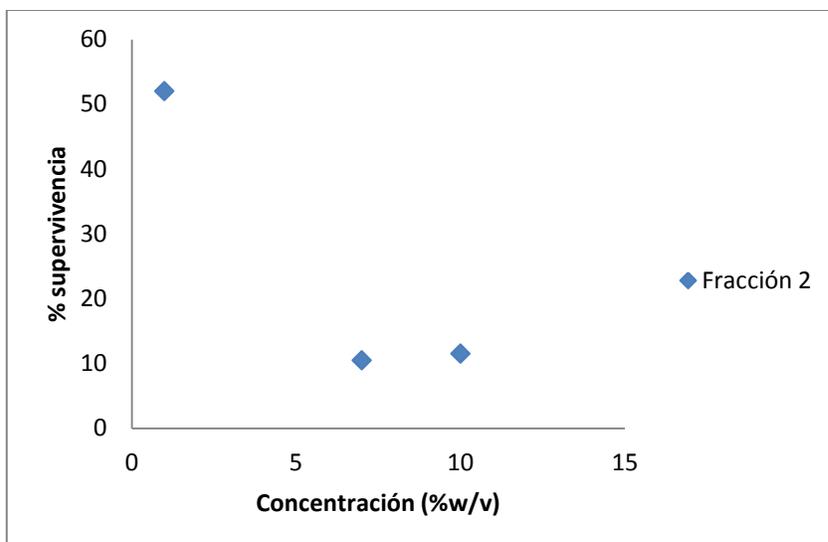


Figura 16. Gráfica de % de supervivencia vs concentración de la fracción 2

iii. Fracción 3

La fracción 3 mostro buena actividad al igual que la fracción 2, la IC_{50} pudo ser calculado el cual fue de 5.03 % w/v, la CCF muestra la presencia de mínimo 6 compuestos.

Tabla 24. Análisis de antiproliferación de la tercera fracción obtenida en la CC

Fracción 3	Absorbancia	% supervivencia
Control	0.623 ± 0.062	100
DMSO	0.580 ± 0.091	100
1	0.474 ± 0.047	81.72
7	0.122 ± 0.036	21.10
14	0.056 ± 0.009	9.72

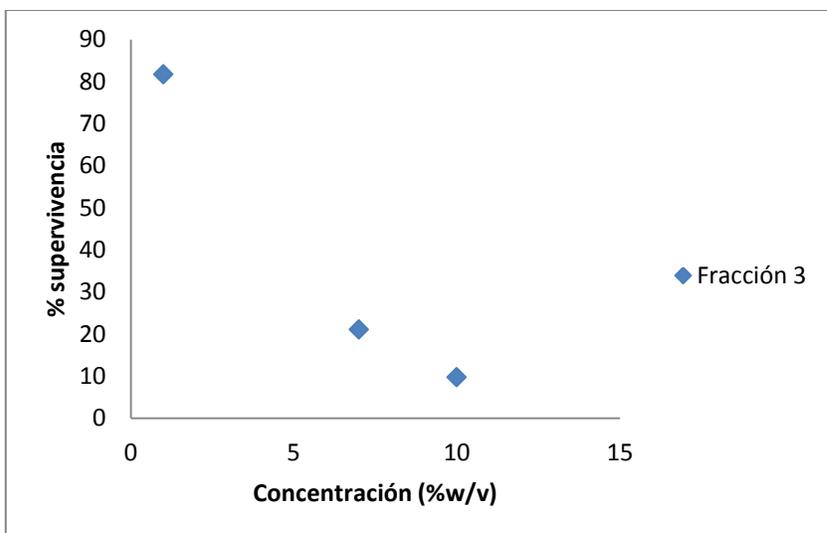


Figura 17. Gráfica de % de supervivencia vs concentración de la fracción 3

iv. Fracción 4

La fracción 4 tuvo resultados similares a la fracción 3, por lo que el compuesto activo puede estar presente en ambas muestras, sin embargo la CCF muestra que la fracción 4 tiene 3 compuestos diferentes, la IC_{50} de la fracción es de 4.95 % w/v.

Tabla 25. Análisis de antiproliferación de la cuarta fracción obtenida en la CC

Fracción 4	Absorbancia	% supervivencia
Control	0.623 ± 0.062	100
DMSO	0.580 ± 0.091	100
1	0.518 ± 0.030	89.3
7	0.048 ± 0.003	8.22
14	0.061 ± 0.008	10.47

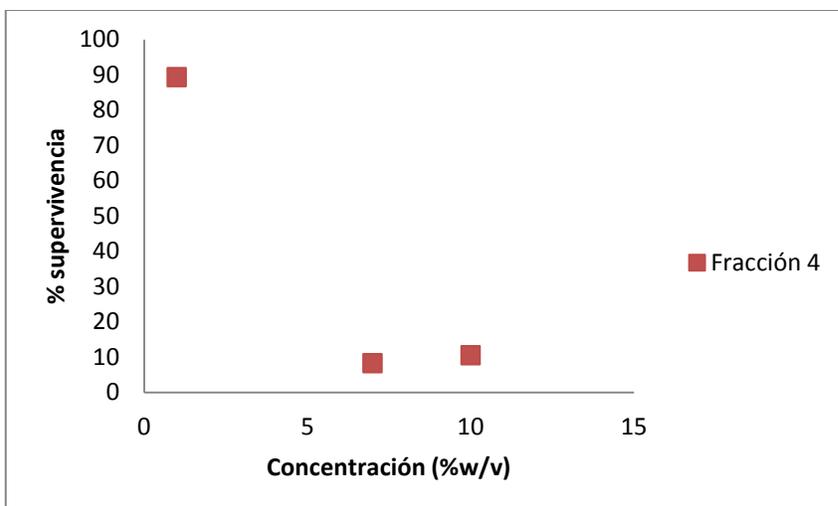


Figura 18. Gráfica de % de supervivencia vs concentración de la fracción 4

v. Fracción 5

La quinta fracción también tiene actividad antiproliferativa, aunque menor que las fracciones anteriores, ya que la IC_{50} fue de 6.76 % w/v, la CCF muestra por lo menos 3 compuestos diferentes.

Tabla 26. Análisis de antiproliferación de la quinta fracción obtenida en la CC

Fracción 5	Absorbancia	% supervivencia
Control	1.077 ± 0.275	100
DMSO	0.513 ± 0.055	100
1	0.609 ± 0.064	118.72
7	0.179 ± 0.018	34.89
10	0.113 ± 0.012	22.09

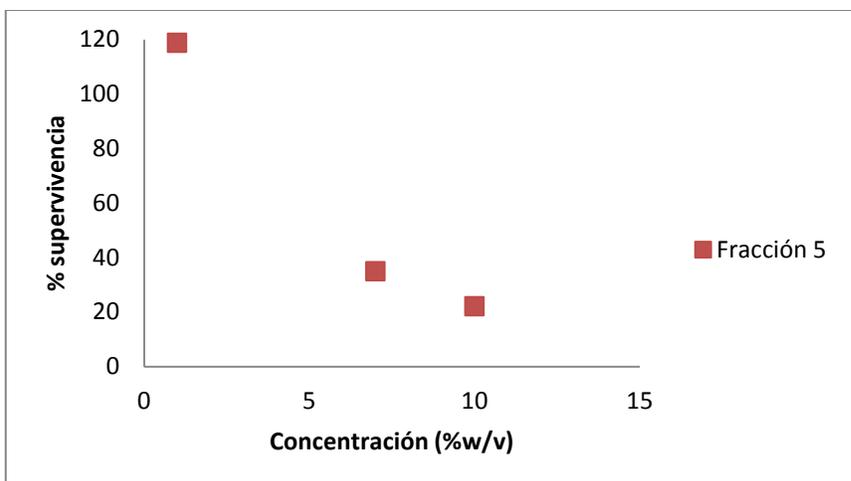


Figura 19. Gráfica de % de supervivencia vs concentración de la fracción 5

vi. Fracción 6

La fracción 5 y 6 mostraron actividad antiproliferativa similar por lo que a pesar de mostrar cambios pequeños en la CCF, los compuestos activos podrían ser los mismos en ambas muestras, la IC₅₀ fue de 7.81 % w/v.

Tabla 27. Análisis de antiproliferación de la sexta fracción obtenida en la CC

Fracción 6	Absorbancia	% supervivencia
Control	0.474 ± 0.033	100
DMSO	0.459 ± 0.016	100
1	0.520 ± 0.039	113.45
4	0.395 ± 0.038	86.12
7	0.143 ± 0.012	31.11
10	0.123 ± 0.017	26.89
14	0.075 ± 0.010	16.28

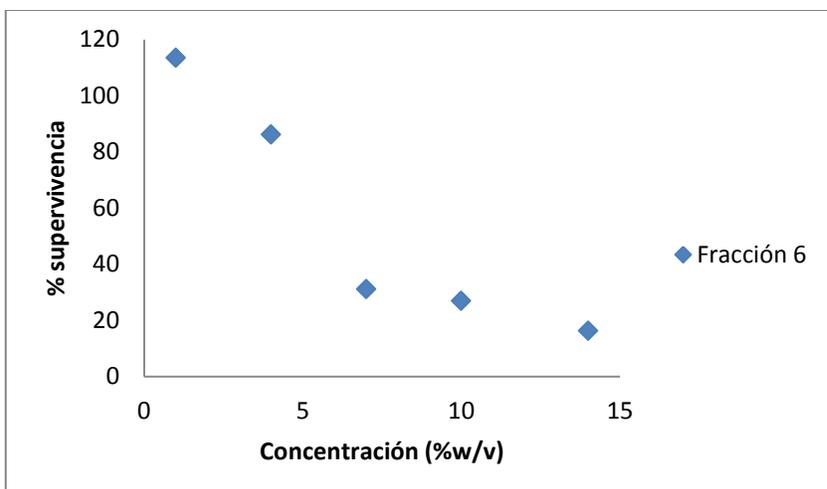


Figura 20. Gráfica de % de supervivencia vs concentración de la fracción 6

vii. Fracción 7

La fracción 7 no mostro actividad antiproliferativa significativa ya que a pesar de ser proba a concentraciones mayores, hasta 14 % w/v, no fue posible calcular la IC₅₀ de la fracción.

Tabla 28. Análisis de antiproliferación de la séptima fracción obtenida en la CC

Fracción 1	Absorbancia	% supervivencia
Control	0.574 ± 0.027	100
DMSO	0.560 ± 0.046	100
1	0.418 ± 0.026	74.63
4	0.388 ± 0.006	69.33
7	0.485 ± 0.036	86.72
10	0.420 ± 0.048	74.99
14	0.444 ± 0.052	79.33

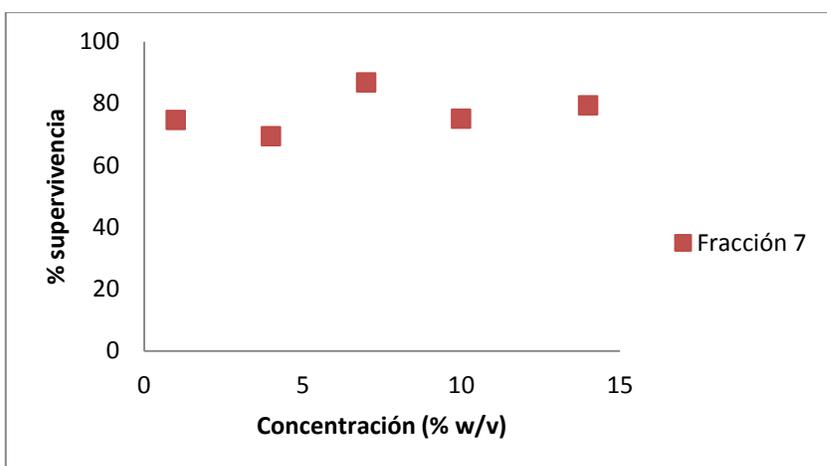


Figura 21. Gráfica de % de supervivencia vs concentración de la fracción 7

VII. CONCLUSIONES

- El extracto crudo de *Fusarium sp* es el de mayor actividad con una IC₅₀ de 0.00005 % v/v para la réplica 1 y 0.00032 % v/v para la 2
- El extracto crudo de *Graphostroma sp* tiene actividad con una IC₅₀ de 0.3 % v/v para la réplica 1 y 0.26 % v/v para la 2
- Los extractos crudos de *Hypoxyylon falciforme* mostraron actividad a altas concentraciones, la 1° replica muestra menor actividad que la segunda
- Los extractos crudos de *Biscognauxia mediterranea* no alcanzaron la IC₅₀
- La cepa de *Graphostroma sp* es la seleccionada para el cultivo masivo y purificación por su buena actividad y probabilidades de encontrar nuevos compuestos.
- La segunda fracción de la cromatografía en columna es la de mayor actividad con una IC₅₀ por debajo de 1% w/v

BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Tonani M., Campos-de-Carvalho E.(2008), Riesgo de cáncer y comportamientos preventivos: la persuasión como una estrategia de intervención, Rev Latino-am Enfermagem, 16(5):864-70
- ² American Cancer Society (2012) Consultado el 23 de enero de 2013 en: <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer>
- ³ National Cancer Institute (2012). ¿Qué es el cáncer? Consultado el 25 de enero del 2013 en: <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es>
- ⁴ Akulapalli, S. (2009) History of cancer, ancient and modern treatment methods. J Cancer Sci Ther 2, 1-4.
- ⁵ Andreeff M., Goodrich D.W. y Pardee A.B. (2000) Cell Proliferation, Differentiation, and Apoptosis, National Institutes of Health
- ⁶ Arroyo, J. A., Maharabir, P. G., Yelkaira, V. B., Li, E. P., Tomás, G. C. (2005) Actividad citotóxica in vitro de la mezcla de Annona muricata y Krameria lappacea sobre células cancerosas de glándula mamaria, pulmón y sistema nervioso central. Rev Peru Med Exp. 22, 65-74.
- ⁷ Magno G., Joris I.(1995) Apoptosis, oncosis y necrosis. An overview of cell death. Am J Pathol 146: 3-16
- ⁸ Organización Mundial de la Salud (2008) consultado el 30 de enero de 2013 en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- ⁹ Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2008) consultado el 30 de enero de 2013 en: <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2011/cancer/11.asp?s=inegi&c=2781&ep=51>
- ¹⁰ Malil S., Cusidó R.M., et al. (2011) Production of the anticancer drug Taxol in Taxus baccata suspension cultures: A review. Elsevier, Process Biochemistry 46, 23–34
- ¹¹ Bacon C.W., White J.F., (2000) Microbial Endophytes. Marcel Dekker, New York, pp: 341-388.
- ¹² Burton J.D.(2005) The MTT Assay to Evaluate Chemosensitivity. Methods in Molecular Medicine, vol. 110: Chemosensitivity: Vol. 1: In Vitro Assays
- ¹³ Miyuki F., Tsukada M. et al. (2011) Hypoxyylonols C-F, Benzo[j]fluoranthenes from Hypoxyylon truncatum. J. Nat. Prod. 2012, 75, 22–25.

- ¹⁴ Piettre A., Chevenier E. et al. (2002) Synthetic Approach to Hypoxyxylone, Novel Inhibitor of Topoisomerase I. *Organic Letters* 2002, Vol.4, No. 18, 3139-3142
- ¹⁵ Kharwar R. N., Mishra A. et al. (2011) Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. *Nat. Prod. Rep.*, 2011, 28, 1208
- ¹⁶ Yang-Min M., Hong-Chi Z. et al. (2012) Secondary Anti-fungi Metabolites From The Endophytic Fungus *Fusarium sp.* *Chemistry of Natural Compounds*, Vol. 48, No. 1
- ¹⁷ McLean M. (1996) The phytotoxicity of *Fusarium* metabolites: An update since 1989. *Mycopathologia* 133: 163-17

Anexo A

Para el análisis de antiproliferación se utilizaron las siguientes diluciones:

Tabla 1. Cálculos del extracto de la cepa HA 40

Concentraciones (% v/v)	µL en el pozo	µL en el pozo con dilución del extracto 1:4	Concentración DMSO	Dilución DMSO
0.3	3	12	0.15	1:16
0.5	5	20	0.25	1:16
0.6	6	24	0.3	1:16
0.7	7	28	0.35	1:16
0.75	7.5	30	0.375	1:16
0.8	8	32	0.4	1:16
0.9	9	36	0.144	1:25
1.2	12	48	0.192	1:25
1.5	15	60	0.24	1:25
2	20	80	0.32	1:25
2.25	22.5	90	0.563	1:16
2.4	24	96	0.6	1:16
4	40	160	0.16	1:100
5	50	200	0.2	1:100
6	60	240	0.24	1:100
7	70	280	0.28	1:100

Tabla 2. Cálculos del extracto de la cepa SG 22

Concentraciones (% v/v)	µL en el pozo	µL en el pozo con dilución del extracto 1:8	Concentración DMSO	Dilución DMSO
0.1	1	8	0.1	1:8
0.2	2	16	0.2	1:8
0.3	3	24	0.3	1:8
Concentraciones (% v/v)	µL en el pozo	µL en el pozo con dilución del extracto 1:4	Concentración DMSO	Dilución DMSO
0.5	5	20	0.125	1:16
0.6	6	24	0.15	1:16
0.7	7	28	0.175	1:16
0.1	1	4	0.04	1:10
0.2	2	8	0.08	1:10
0.25	2.5	10	0.1	1:10
0.3	3	12	0.12	1:10
0.35	3.5	14	0.14	1:10
0.45	4	18	0.18	1:10

Tabla 3. Cálculos del extracto de la cepa TA 76

Concentraciones (% v/v)	µL en el pozo	µL en el pozo con dilución del extracto 1:4	Concentración DMSO	Dilución DMSO
0.5	5	20	0.25	1:16
0.6	6	24	0.3	1:16
0.7	7	28	0.35	1:16
0.3	3	12	0.06	1:20
0.5	5	20	0.1	1:20
0.7	7	28	0.14	1:20
0.9	9	36	0.18	1:20
1	10	40	0.2	1:20
1.2	12	48	0.24	1:20
2	20	80	0.08	1:100
2.5	25	100	0.1	1:100
4	40	160	0.16	1:100
5	50	200	0.2	1:100
6	60	240	0.24	1:100
3	30	120	0.12	1:100

Tabla 4. Cálculos del extracto de la cepa SG 01

Concentraciones (% v/v)	µL en el pozo	µL en el pozo	Dilución extracto	Concentración DMSO	Dilución DMSO
0.00035	0.0035	1.4	1:400	0.00035	1:400
0.0035	0.035	14	1:400	0.0035	1:400
0.035	0.35	140	1:400	0.035	1:400
0.00003	0.0003	24	1:80000	0.00003	1:80000
0.00015	0.0015	12	1:8000	0.00015	1:8000
0.0002	0.002	16	1:8000	0.0002	1:8000
0.0003	0.003	24	1:8000	0.0003	1:8000
0.000024	0.00024	12	1:50000	0.00024	1:50000
0.00003	0.0003	15	1:50000	0.0003	1:50000
0.00004	0.0004	20	1:50000	0.0004	1:50000
0.00005	0.0005	5	1:10000	0.0005	1:10000
0.00008	0.0008	8	1:10000	0.0008	1:10000
0.0001	0.001	10	1:10000	0.001	1:10000
0.0002	0.002	20	1:10000	0.002	1:10000
0.00014	0.0014	14	1:10000	0.0014	1:10000
0.00016	0.0016	16	1:10000	0.0016	1:10000
0.00018	0.0018	18	1:10000	0.0018	1:10000

Anexo B

Para calcular la cantidad de gel de sílice necesario para la columna se utilizó la relación de que por cada gramo de extracto se requieren 20 g de gel de sílice.

Tabla 1. Masa obtenida de extracto de cada uno de los cultivos masivos realizados

Cultivo	Tiempo de cultivo	Masa de extracto obtenida
Reactor	8 días	Micelio: 0.53626 g
		Caldo: 0.5229 g
Garrafón de 5L	7 días	0.3641 g
1°Garrafón de 15 L	7 días	Micelio: 0.96743 g
		Caldo: 0.55204 g
2°Garrafón de 15 L	7 días	Micelio: 0.23493 g
		Caldo: 2.49373 g
Total		5.67139 g

$$5.67139 \text{ g} \left| \frac{20 \text{ g de gel de sílice}}{1 \text{ g de extracto}} \right| = 113.4278 \text{ g de gel de sílice}$$

Se calcula el volumen que ocupa la masa de gel de sílice sabiendo que la densidad del gel de sílice es de $0.4556 \frac{\text{g}}{\text{mL}}$

$$V_{\text{sílice}} = \frac{113.4278 \text{ g de gel de sílice}}{0.4556 \frac{\text{g}}{\text{mL}}} = 248.9635 \text{ mL}$$

Para saber si el volumen de gel de sílice no sobrepasa el volumen de la columna se calcula el volumen de la columna.

$$D_{\text{externo}} = 2.814 \text{ cm}$$

$$\text{Espesor: } 0.216 \text{ cm}$$

$$D_{\text{interno}} = 2.814 \text{ cm} - 2(0.216 \text{ cm}) = 2.382 \text{ cm}$$

$$r_{\text{interno}} = \frac{2.382 \text{ cm}}{2} = 1.191 \text{ cm}$$

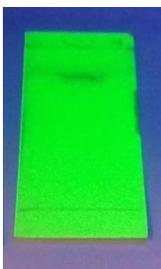
$$h_{\text{columna}} = 79.1 \text{ cm}$$

$$V_{\text{columna}} = \pi(1.191 \text{ cm})^2(79.1 \text{ cm}) = 352.4925 \text{ cm}^3$$

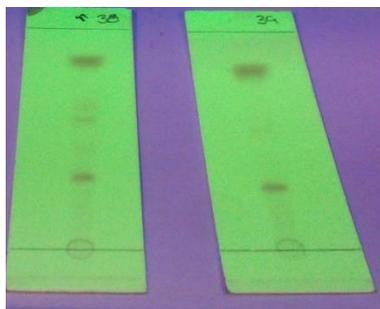
Anexo C

Durante la CC con forme las fracciones de 8 mL se iban obteniendo se les realizo una CCF y en base a los resultados se juntaron las fracciones con patrones iguales. A las fracciones 7, 8 9 y 10 no se registró la CCF debido a que las fracciones ya no eran de 8 mL, se realizaban de acuerdo al cambio de coloración. Las fracciones 11 y 12 no se realizaron las CCF debido a que fueron las obtenidas después de recuperar el gel de sílice de la columna y separarlo de acuerdo a su coloración.

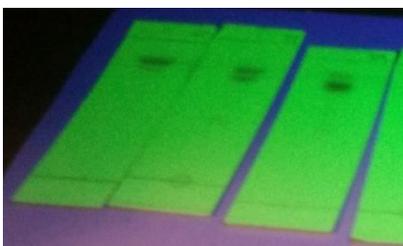
Fracción 1



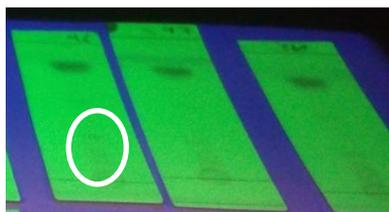
Fracción 4



Fracción 2



Fracción 5



Fracción 3



Fracción 6

